



*Caracterización de las aguas residuales y
calibración del modelo matemático BNRM1
para la simulación de los procesos de
eliminación biológica de materia orgánica y
nutrientes.*

Memoria que, para optar al grado de doctor de la Universitat de València,
presenta MARCELA NOEMÍ GATTI

Valencia, 2009

Directores: Aurora Seco Torrecillas

José Ferrer Polo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a los doctores Aurora Seco Torrecillas y José Ferrer Polo por el tiempo dedicado a la dirección de esta tesis y por haber confiado en mí. Sin su valiosa ayuda no hubiese podido alcanzar este objetivo.

A la Consellería de Educación, Cultura y Deporte por la beca concedida durante cuatro años para la realización de esta tesis.

Al Departamento de Ingeniería Química de la Universitat de València por el buen trato y ayuda que siempre he recibido.

A todos mis compañeros del grupo de investigación CALAGUA. Especialmente a Tatiana por los momentos tan bonitos que hemos compartido y por haberme brindado su amistad. También deseo agradecerle a Vicky por el apoyo sincero y la ayuda inestimable que he recibido por su parte tanto a nivel profesional como personal.

A Cristina, Javier, Laura Pastor, Laura Segovia, Luis, Luisa y Nuria por ser grandes compañeros de trabajo que han logrado que me sienta como en casa. Me han mostrado que siempre es posible encontrar gente hermosa en el camino que uno recorre.

También deseo agradecer a Berta, Emérita, Juan y Sara, por su compañerismo y porque de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo. Así también quiero expresar mi agradecimiento a Estela por los momentos compartidos.

A Alberto, Daniel y Josep por su calidad humana.

Especialmente a mi familia en Argentina que desde el principio me ha brindado un gran apoyo en este proyecto. Principalmente, esta dedicatoria

es para mis Padres que si bien son los que más han padecido mi ausencia siempre me han animado a continuar.

Finalmente, dedico este trabajo a mi hijo Francisco por todo el tiempo que como Madre no le he podido brindar. Especialmente a Guillermo porque sin vos no lo hubiese logrado. Tu apoyo incondicional y tu amor han sido fundamentales para mí en esta etapa de nuestras vidas.

A Francisco y Guillermo.

RESUMEN

RESUMEN

La necesidad de profundizar en el conocimiento del proceso de depuración biológica de las aguas residuales, para la eliminación de materia orgánica y nutrientes, ha conducido a la formulación de modelos matemáticos que permitan reproducir el comportamiento del sistema. En este sentido, el grupo de investigación CALAGUA ha desarrollado el modelo BNRM1, el cual considera no sólo la actividad de las bacterias heterótrofas, autótrofas y acumuladoras de fósforo sino que además tiene en cuenta la actividad de microorganismos fermentativos en el proceso de fangos activados, como las bacterias acidogénicas.

En este trabajo se ha propuesto como objetivo principal lograr una adecuada simulación del funcionamiento de una estación depuradora de aguas residuales. Para ello se ha planteado estudiar la caracterización de la materia orgánica presente en el agua residual y el procedimiento de calibración de los parámetros del modelo BNRM1.

En relación al procedimiento de caracterización de la materia orgánica se ha llevado a cabo un estudio comparativo del método de caracterización físico-químico y el respirométrico. De acuerdo a los resultados, el procedimiento físico-químico permite cuantificar de forma adecuada las componentes biodegradables de la materia orgánica. Así también se ha determinado que el tamaño de filtro de 0.1 μm es el más conveniente para separar la componente soluble de la particulada.

El procedimiento actual de calibración del modelo BNRM1 se basa en una metodología de identificación de parámetros a través de experimentos específicos en laboratorio. En este trabajo se ha centrado el esfuerzo en estudiar, en primer lugar, de qué forma es posible mejorar este procedimiento basado en los ensayos de laboratorio. Para ello se ha considerado conveniente incorporar la concentración del polímero polihidroxialcanoato, X_{PHA} , en el procedimiento de calibración de las

bacterias PAO en condiciones aerobias dado que este polímero juega un papel fundamental en el metabolismo de estos microorganismos. Además, por medio del análisis de sensibilidad se ha desarrollado un plan de muestreo estratégico de los diferentes experimentos de calibración. Este plan propone incrementar la frecuencia de las muestras en el intervalo del experimento donde los parámetros describen una mayor sensibilidad. De esta manera es posible mejorar la identificabilidad de los mismos.

Así también, se ha propuesto una metodología de calibración del modelo BNRM1 la cual considera no sólo la información experimental recogida en ensayos específicos sino también datos dinámicos del proceso. Estos datos se han empleado en la identificación de los parámetros más sensibles que no se determinan en los experimentos específicos. Para el desarrollo de esta propuesta se ha incluido un análisis de sensibilidad del sistema en estado estacionario. Este análisis ha permitido seleccionar las variables más sensibles a las perturbaciones de los parámetros. Además, se ha podido determinar el conjunto de parámetros potencialmente identificable a partir de los datos disponibles. Al ajustar los parámetros seleccionados con este procedimiento ha sido posible representar en forma adecuada los datos dinámicos del efluente.

Finalmente, se ha observado que la edad de fango ejerce una influencia muy importante en el proceso de eliminación de fósforo. A partir de la información experimental recogida en esta tesis se ha apreciado un aumento de la población de bacterias GAO y una disminución de la concentración de bacterias PAO cuando se incrementa el tiempo de retención celular del sistema.

RESUM

La necessitat d'aprofundir en el coneixement del procés de depuració biològica de les aigües residuals, per a l'eliminació de matèria orgànica i nutrients, ha conduït a la formulació de models matemàtics que permeten reproduir el comportament del sistema. En aquest sentit, el grup d'investigació CALAGUA ha desenvolupat el model BNRM1, el qual considera no sols l'activitat dels bacteris heteròtrofs, autòtrofes i acumuladores de fòsfor sinó que a més té en compte l'activitat dels microorganismes fermentatius en el procés de fangs activats, com els bacteris acidogènics.

En aquest treball s'ha proposat com a objectiu principal aconseguir una adequada simulació del funcionament d'una estació depuradora d'aigües residuals. Per això s'ha plantejat estudiar la caracterització de la matèria orgànica de l'aigua residual i el procediment de calibratge dels paràmetres del model BNRM1.

En relació al procediment de caracterització de la matèria orgànica s'ha realitzat un estudi comparatiu del mètode de caracterització fisicoquímic i el respiromètric. D'acord amb els resultats, el procediment fisicoquímic permet quantificar de forma adequada els components biodegradables de la matèria orgànica. Així també s'ha determinat que la grandària del filtre de 0.1 μm és el més convenient per a separar el component soluble de la suspesa.

El procediment actual de calibratge del model BNRM1 es basa en una metodologia d'identificació de paràmetres a través d'experiments específics en laboratori. L'esforç d'aquest treball s'ha centrat en estudiar, en primer lloc, de quina forma és possible millorar aquest procediment basat en els assajos de laboratori. Per a això s'ha considerat convenient incorporar la concentració del polímer polihidroxialcanoato, X_{PHA} , en el procediment de calibratge dels bacteris PAO en condicions aeròbies, atés que aquest polímer té un paper fonamental en el metabolisme d'aquests microorganismes. A

més, per mitjà de l'anàlisi de sensibilitat s'ha desenvolupat un pla de mostreig estratègic dels diferents experiments de calibratge. Aquest pla proposa incrementar la freqüència de les mostres en l'interval de l'experiment on els paràmetres descriuen una major sensibilitat.

Així també, s'ha proposat una metodologia de calibratge del model BNRM1 la qual considera no sols la informació experimental dels assajos específics sinó també dades dinàmiques del procés. Aquestes dades s'han emprat en la identificació dels paràmetres més sensibles que no es determinen en els experiments específics. Per al desenvolupament d'aquesta proposta s'ha inclòs una anàlisi de sensibilitat del sistema en estat estacionari. Aquesta anàlisi ha permès seleccionar les variables més sensibles a les pertorbacions dels paràmetres. A més, s'ha pogut determinar el conjunt de paràmetres potencialment identificables a partir de les dades disponibles. A l'ajustar els paràmetres seleccionats amb aquest procediment ha sigut possible representar de forma adequada les dades dinàmiques de l'efluent.

Finalment, s'ha observat que l'edat del fang exercix una influència molt important en el procés d'eliminació de fòsfor. A partir de la informació experimental arreplegada en aquesta tesi s'ha observat un augment de la població de bacteris GAO i una disminució de la concentració de bacteris PAO quan s'incrementa el temps de retenció cel·lular del sistema.

SUMMARY

The necessity to improve the knowledge of wastewater treatment for the elimination of organic matter and nutrients has led to the formulation of several mathematical models with the purpose to reproduce the behaviour of the system. In this sense, the research group CALAGUA has developed the model BNRM1. This model considers not only the activity of the heterotrophic, autotrophic and phosphorus accumulating microorganisms but also takes into account the activity of fermentative microorganisms in the activated sludge process as acidogenic bacteria.

The main goal of this work is to perform an adequate simulation of the wastewater treatment process. For this different characterization methods of the organic matter present in the wastewater and the calibration procedure of the BNRM1 model parameters have been studied.

A comparative study of the physico-chemical and the respirometric characterization methods has been carried out. The results have shown the physico-chemical method provides with an adequate characterization procedure of the biodegradable organic matter being the 0.1 μm a suitable filter size for the wastewater fractionation.

The calibration procedure of the BNRM1 model is based on the parameter identification through specific experiments. In this work the improvement of this procedure has been proposed. Firstly, the evolution of the polyhydroxyalcanoate concentration has been considered in the experimental procedure employed for assessing the parameters related to PAO microorganisms in aerobic conditions. Secondly, a sensitivity analysis to the specific experiments was performed in order to develop a better sampling program for each experiment. According to this program the sampling frequency must be increased in the interval of the experiment where the parameters show high sensitivity. In this way the parameter identifiability can be improved.

SUMMARY

Also, a calibration methodology of the BNRM1 model has been proposed. This procedure is based not only on specific laboratory tests but also takes into account dynamic data of the process. Dynamic experimental data of the process were employed in the identification of those parameters with high influence in the BNRM1 model response and not determined through specific experiments. For this, a sensitivity analysis of the system in steady state has been performed. This analysis has allowed determining the model output more sensitive to parameter perturbations and the parameter subset potentially identifiable from the available experimental data. A good correspondence between experimental and simulated data of the effluent was achieved by perturbing the selected parameters through the sensitivity analysis.

The sludge retention time was found to be an important factor in the enhanced biological phosphorus removal. From experimental information obtained in this thesis, the increase of the sludge retention time produced a diminution of the PAO microorganism concentration in the mixed liquor and an increase of GAO microorganisms with the consequent deterioration of the biological phosphorus removal.

ÍNDICE

Caracterización de las aguas residuales y calibración del modelo matemático BNRM1 para la simulación de los procesos de eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes.....3

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Procedencia de la contaminación del agua	2
1.2	Elementos contaminantes del agua	3
1.3	Eutrofización.....	5
1.3.1	Fuentes de eutrofización.....	6
1.3.2	Consecuencias de la eutrofización.....	7
1.3.3	Medidas para evitar la eutrofización	8
1.4	Tratamiento biológico del agua residual	9
1.4.1	Eliminación de materia orgánica	11
1.4.1.1	Regulación de las rutas metabólicas.....	14
1.4.1.2	Factores que influyen en el crecimiento bacteriano	15
1.4.2	Eliminación de nitrógeno.....	15
1.4.2.1	Nitrificación	17
1.4.2.1.1	Factores que influyen en el proceso de nitrificación.....	17
1.4.2.2	Desnitrificación.....	19
1.4.2.2.1	Factores que influyen en la desnitrificación:.....	20
1.4.3	Eliminación de fósforo.....	21
1.4.3.1	Eliminación biológica de fósforo.....	21
1.4.3.2	Metabolismo de la etapa anaerobia	23
1.4.3.3	Metabolismo de la etapa aerobia	27
1.4.3.4	Eliminación de fósforo en condiciones anóxicas	28
1.4.3.5	Bacterias GAO en el proceso biológico.....	29
1.4.3.6	Factores que influyen en el proceso de eliminación de fósforo.....	30
1.4.4	Fermentación.....	33
1.5	Proceso de fangos activados.....	35
1.5.1	Esquema A ² /O y derivados	38
1.5.2	Esquemas secuenciales de alimentación alternativa.....	41
1.6	Modelación matemática de los procesos biológicos	43
1.6.1	Generalidades del modelo biológico	46
1.6.1.1	Estequiometría y cinética de los modelos.....	46
1.6.1.2	Formato y notación del modelo	46
1.6.1.3	Expresiones cinéticas de los procesos biológicos	48
1.6.2	Modelo BNRM1	49
1.6.2.1	Componentes Solubles:.....	50
1.6.2.2	Componentes particulados:	51
1.6.2.3	Ecuaciones de continuidad	53
1.6.2.4	Procesos cinéticos.....	54
1.6.2.4.1	Bacterias Heterótrofas	56
1.6.2.4.2	Bacterias PAO.	58
1.6.2.4.3	Bacterias autótrofas	61
1.6.2.4.4	Bacterias acidogénicas	61
1.6.2.4.5	Bacterias Acetogénicas.....	62
1.6.2.4.6	Bacterias Metanogénicas	62
1.6.2.4.7	Procesos físico-químicos	63
1.6.2.5	Procesos gobernados por el equilibrio.....	66
1.7	Procedimientos de calibración del modelo.....	68
1.7.1	Metodologías de Calibración.....	68
1.7.1.1	Calibración en Estado Estacionario.....	68
1.7.1.2	Calibración Dinámica	69
1.7.1.3	Calibración off-line en laboratorio	70
1.7.2	Análisis de sensibilidad	72

1.7.2.1	Análisis de sensibilidad de los ensayos de calibración off-line.....	73
1.7.2.2	Análisis de sensibilidad en estado estacionario.....	75
1.7.3	Protocolos de Calibración.....	78
1.7.3.1	Protocolo de Calibración BIOMATH.....	78
1.7.3.2	Protocolo de Calibración STOWA.....	80
1.7.3.3	Protocolo de Calibración HSG.....	81
1.7.3.4	Protocolo de Calibración WERF.....	83
1.7.3.5	Semejanzas y diferencias entre los protocolos de calibración.....	84
1.8	<i>Caracterización del agua residual.....</i>	85
1.8.1	Transporte de sustratos a través de la membrana celular.....	86
1.8.2	Caracterización de la materia orgánica.....	88
1.8.2.1	Caracterización Físico-Química del agua residual.....	89
1.8.2.1.1	Fracción de materia orgánica soluble no biodegradable, S _I	90
1.8.2.1.2	Fracción de materia orgánica rápidamente biodegradable, S _s	92
1.8.2.1.3	Fracción de materia orgánica particulada no biodegradable, X _I	93
1.8.2.1.4	Fracción de materia orgánica lentamente biodegradable, X _s	93
1.8.2.2	Caracterización biológica.....	94
1.8.2.2.1	Determinación de DBO.....	94
1.8.2.2.2	Análisis respirométrico.....	95
1.8.3	Caracterización de los nutrientes.....	99
1.8.3.1	Nitrógeno.....	100
1.8.3.2	Fósforo.....	101
1.9	<i>Medición de X_{PHA}.....</i>	101
1.9.1	Generalidades de la Cromatografía Gaseosa.....	102
1.9.2	Condiciones de trabajo.....	104
2	OBJETIVOS.....	109
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	115
3.1	<i>Planta Piloto.....</i>	115
3.1.1	Esquema de operación 1.....	115
3.1.2	Esquema de operación 2.....	120
3.1.3	Operación y seguimiento de la planta piloto.....	123
3.2	<i>Caracterización del Agua Residual.....</i>	124
3.2.1	Método Físico-químico.....	125
3.2.2	Método Respirométrico.....	125
3.2.2.1	Respirómetro.....	125
3.2.2.2	Análisis respirométricos.....	127
3.2.3	Diseño experimental de filtración.....	128
3.3	<i>Medición de X_{PHA}.....</i>	129
3.3.1	Equipo de Cromatografía Gaseosa.....	130
3.3.2	Preparación de la muestra.....	130
3.3.3	Procedimiento de calibración.....	131
3.4	<i>Programación de las experiencias.....</i>	133
4	RESULTADOS.....	139
4.1	<i>Seguimiento de la Planta Piloto.....</i>	139
4.1.1	Estudio experimental para TRC de 6.5 días.....	139
4.1.2	Estudio experimental para TRC de 8 días.....	143
4.1.3	Estudio experimental para TRC de 9 días.....	146
4.2	<i>Caracterización del agua residual.....</i>	150
4.2.1	Influencia del tamaño de filtro en el fraccionamiento del agua residual.....	151

4.2.2	Influencia de F_0/X_0 en la determinación de la fracción S_s por medio del análisis respirométrico.....	156
4.2.3	Estudio comparativo de los métodos de caracterización para la determinación de las fracciones S_s y X_s	164
4.3	<i>Metodología de Calibración del modelo BNRM1.....</i>	166
4.3.1	Calibración off-line del modelo BNRM1	166
4.3.1.1	Procedimiento de calibración off-line	167
4.3.1.1.1	Bacterias Heterótrofas	168
4.3.1.1.2	Bacterias Autótrofas	171
4.3.1.1.3	Bacterias PAO	173
4.3.1.1.4	Tratamiento global de la información	182
4.3.1.1.5	Factores de eficacia en la desnitrificación	186
4.3.1.1.6	Resultados de la calibración del modelo BNRM1	190
4.3.1.1.7	Simulación del comportamiento de la Planta Piloto	191
4.3.1.2	Análisis de Sensibilidad de los ensayos de calibración off-line	195
4.3.1.2.1	Bacterias heterótrofas	195
4.3.1.2.2	Bacterias autótrofas	197
4.3.1.2.3	Bacterias PAO	198
4.3.2	Propuesta de calibración del modelo BNRM1	207
4.3.2.1	Etapa N°1: Calibración off-line del modelo BNRM1	209
4.3.2.1.1	Bacterias Heterótrofas:	210
4.3.2.1.2	Bacterias Autótrofas	211
4.3.2.1.3	Bacterias PAO	212
4.3.2.1.4	Factores de eficacia de la desnitrificación.....	216
4.3.2.1.5	Resultados de la Calibración off-line del modelo BNRM1 a TRC = 9 días.....	218
4.3.2.2	Etapa N°2: Simulación del Estado Estacionario a TRC = 9 días	219
4.3.2.3	Etapa N°3: Análisis de sensibilidad del sistema en Estado Estacionario	220
4.3.2.4	Caracterización dinámica.....	229
4.3.2.5	Etapa N°4: Calibración dinámica.....	233
4.4	<i>Análisis Comparativo de los parámetros calibrados en experimentos off-line</i>	240
4.4.1	Parámetros calibrados en los experimentos off-line	240
4.4.1.1	Bacterias heterótrofas:	241
4.4.1.2	Bacterias autótrofas:	242
4.4.1.3	Bacterias PAO:.....	242
4.4.2	Producción de polihidroxialcanoatos en condiciones anaerobias	244
4.4.3	Análisis microbiológico del fango	246
5	CONCLUSIONES	255
6	BIBLIOGRAFÍA.....	263
	<i>ANEJO I.....</i>	277
	<i>ANEJO II</i>	281

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

Las fuentes naturales de agua (ríos, lagos, mares, etc.) sufren habitualmente procesos de contaminación que ocasionan una variación en la calidad del agua. Un proceso de contaminación habitual se produce a través de las precipitaciones. El agua de lluvia incorpora impurezas al entrar en contacto con el aire y con el suelo. Estos contaminantes son arrastrados hasta ser vertidos en fuentes receptoras generando un incremento en las concentraciones de estos compuestos en el agua. Esta contaminación natural es contrarrestada por un proceso de auto depuración del sistema que tiene lugar en las aguas naturales.

Al mismo tiempo que la contaminación del agua por procesos naturales, se produce otra muy notable de procedencia humana que hace sobrepasar la capacidad de auto depuración de la naturaleza. Al ser el agua un recurso imprescindible para la vida humana y para el desarrollo socioeconómico, industrial y agrícola, una contaminación a partir de cierto nivel puede plantear un problema de salud pública. Por esta razón, las aguas residuales derivadas de la actividad humana, deben recibir un tratamiento de depuración el cual permita gestionarlas en forma adecuada. De esta manera es posible el vertido de las mismas en cuerpos de aguas receptoras sin ocasionar un daño al medio ambiente, preservando así los recursos naturales.

Adicionalmente, una problemática a la cual se enfrenta España y el resto de los países de la cuenca mediterránea, es la disminución de las reservas hídricas. Esta situación, aunque agravada hoy por los efectos del cambio climático mundial, no es nueva. Los países Mediterráneos, siempre han estado caracterizados por un serio desequilibrio hídrico entre el agua demandada por la población y los recursos disponibles. La reutilización del agua residual urbana, previo tratamiento, aparece aquí como una herramienta a considerar con el objetivo de aliviar esta escasez. Los efluentes residuales representan una reserva hídrica alternativa, la cual

podría ser reutilizada con objeto de reducir la presión sobre los recursos hídricos naturales.

Las cuestiones planteadas, han conducido al desarrollo de un marco legal. La finalidad de este marco legal es regular la calidad del agua que puede ser vertida en los cuerpos naturales de agua. Cabe destacar la Directiva 91/271/CEE de la Unión Europea sobre el Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas, aprobada en mayo de 1991. Dicha directiva urge a los estados miembros a tomar las medidas para lograr que todas las aguas residuales sean adecuadamente recogidas y sometidas a tratamientos secundarios o equivalentes antes de ser vertidas.

Dada la legislación existente en relación al tratamiento de las aguas residuales y a la posibilidad de reutilización de las mismas para restablecer los recursos hídricos, se ha invertido un gran esfuerzo en el desarrollo y optimización de los procesos de depuración. Existe una gran variedad de metodologías de depuración de las aguas residuales, entre las cuales se pueden citar procesos físicos, químicos y biológicos. En particular, el proceso biológico de depuración del agua residual ha ganado un gran interés, al permitir la eliminación de materia orgánica y nutrientes sin la adición de reactivos químicos. El proceso biológico genera una menor cantidad de fangos que el proceso químico, presentado menores costes de tratamiento y evacuación de los mismos.

1.1 PROCEDENCIA DE LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA

La contaminación de las aguas puede producirse por causas naturales o como consecuencia de actividades humanas. En la actualidad la más importante, sin duda, es la provocada por el hombre. El desarrollo y la industrialización suponen un mayor uso de agua y una gran generación de residuos, muchos de los cuales son vertidos en las fuentes receptoras de

aguas naturales. A continuación se expondrán las principales causas de contaminación antropogénicas:

1. **Industria.** Según el tipo de industria se producen distintas clases de residuos. En general, esta actividad genera metales tóxicos. Normalmente en los países desarrollados muchas industrias poseen eficaces sistemas de depuración de las aguas. Sin embargo, en algunos países en vías de desarrollo la contaminación del agua por residuos industriales es muy importante.

2. **Vertidos urbanos.** La actividad doméstica produce principalmente residuos orgánicos, pero el alcantarillado arrastra además todo tipo de sustancias: sales, ácidos, emisiones de los automóviles (hidrocarburos, plomo, otros metales), etc.

3. **Navegación.** Produce diferentes tipos de contaminación, especialmente hidrocarburos. Los vertidos de petróleo, accidentales o no, provocan importantes daños ecológicos.

4. **Agricultura y ganadería.** Los trabajos agrícolas y ganaderos producen vertidos de pesticidas, fertilizantes y restos orgánicos de animales y plantas que contaminan de una forma difusa pero muy notable las aguas.

1.2 ELEMENTOS CONTAMINANTES DEL AGUA

Hay un gran número de contaminantes del agua los cuales pueden ser clasificados de la siguiente manera:

1. **Microorganismos patógenos.** Son diferentes tipos de bacterias, virus, protozoos, etc., principales responsables de la transmisión de enfermedades como el cólera, tifus, gastroenteritis diversas, hepatitis A, etc. En los países en vías de desarrollo las enfermedades producidas por estos patógenos son uno de los motivos más importantes de muerte prematura, sobre todo en

niños. Normalmente estos microorganismos llegan al agua en las heces y otros restos orgánicos que producen las personas infectadas.

2. Desechos orgánicos. Son el conjunto de residuos orgánicos producidos por los seres humanos, ganado, etc. Incluyen heces y otros materiales que pueden ser descompuestos por bacterias aeróbicas, es decir en procesos con consumo de oxígeno. Cuando este tipo de desechos se encuentran en exceso, la proliferación de bacterias agota el oxígeno, impidiendo de esta manera el crecimiento de peces y otros seres vivos que necesitan oxígeno.

3. Sustancias químicas inorgánicas. En este grupo están incluidos ácidos, sales y metales tóxicos como el mercurio y el plomo. Si están en cantidades altas pueden causar graves daños a los seres vivos, disminuir los rendimientos agrícolas y provocar problemas de corrosión en sistemas refrigerantes.

4. Nutrientes. Los nitratos y fosfatos son sustancias solubles en agua necesarias para el desarrollo de seres vivos, pero si se encuentran en cantidad excesiva inducen el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos. Cuando éstos mueren, son descompuestos por microorganismos, que agotan el oxígeno del agua impidiendo el desarrollo de la vida acuática.

5. Compuestos orgánicos sintéticos. Muchos compuestos orgánicos como petróleo, gasolina, plásticos, plaguicidas, disolventes, detergentes, etc. acaban en el agua y permanecen, en algunos casos, largos períodos de tiempo. Estos productos, fabricados por el hombre, tienen estructuras moleculares complejas difíciles de degradar por los microorganismos.

6. Sedimentos y materiales suspendidos. En términos de masa total, la mayor fuente de contaminación del agua está constituida por muchas partículas provenientes del suelo y arrastradas a las aguas. La turbidez que provocan en el agua dificulta la vida de algunos organismos, y los sedimentos que se van acumulando destruyen sitios de alimentación o

desove de los peces, rellenan lagos o pantanos y obstruyen canales, rías y puertos.

7. Sustancias radiactivas. Isótopos radiactivos solubles pueden estar presentes en el agua y, a veces, se pueden ir acumulando a lo largo de las cadenas tróficas, alcanzando concentraciones considerablemente más altas en algunos tejidos vivos que las que tenían en el agua.

8. Contaminación térmica. El agua caliente liberada por centrales de energía o procesos industriales eleva, en ocasiones, la temperatura de ríos o embalses disminuyendo su capacidad de contener oxígeno y afectando la vida de los organismos.

De los contaminantes mencionados en este apartado, la presencia de nutrientes puede provocar alteraciones importantes en los sistemas acuáticos. En el apartado siguiente se da una descripción de la problemática asociada a la presencia de nutrientes en el agua.

1.3 EUTROFIZACIÓN

Cuando una fuente de agua natural posee una concentración baja de nutrientes se considera que es *oligotrófica*. Los cuerpos de agua que presentan esta característica tienen un crecimiento pobre de algas, la luz penetra bien y las plantas y animales que se desarrollan son los característicos de aguas bien oxigenadas.

Si la concentración de nutrientes aumenta, el sistema se convierte en *eutrófico*. En ecología el término eutrofización, designa el enriquecimiento en nutrientes de un ecosistema. El uso más extendido se refiere específicamente al aporte más o menos masivo de nutrientes inorgánicos en un ecosistema acuático.

Los nutrientes que más influyen en el proceso de eutrofización son el fósforo y el nitrógeno. En algunos ecosistemas el factor limitante es el fósforo, como sucede en la mayoría de los lagos de agua dulce, pero en muchos mares el factor limitante es el nitrógeno.

En los últimos 20 o 30 años las concentraciones de nitrógeno y fósforo en muchos mares y lagos prácticamente se han duplicado. La mayor parte de esta contaminación llega a través de los ríos. En el caso del nitrógeno, una elevada proporción (alrededor del 30%) llega a través de la contaminación atmosférica. El fósforo es absorbido con más facilidad por las partículas del suelo y es arrastrado por la erosión o disuelto por las aguas de escorrentía superficiales.

1.3.1 Fuentes de eutrofización

Si bien existe un proceso de eutrofización natural causado principalmente por las condiciones geomorfológicas, climáticas y biológicas del medio acuático, son los aportes humanos los que desencadenan una eutrofización notable. Estas aportaciones son de naturaleza diversa:

La contaminación agropecuaria, sobre todo la contaminación difusa de los suelos y de los acuíferos por fertilizantes inorgánicos de origen industrial o extractivo; o por excrementos animales, a causa de una producción masiva de ganado, aves, peces, etc. Estas fuentes aportan nitrógeno, en forma de nitrato y amonio, y fósforo, como fosfato, a la vez que cationes como potasio (K^+), magnesio (Mg^{++}), etc.

Las contaminaciones forestales, por abandono en los ríos de residuos forestales y restos del aprovechamiento maderero, lo que aumenta la materia orgánica disuelta, favoreciendo la proliferación de flora eutrófica como berros y lenteja de agua, que a su vez remansa la corriente y disminuye el espejo del agua.

La contaminación industrial por aporte de óxidos de nitrógeno (NO_x) y óxidos de azufre (SO_x) a la atmósfera. Estos compuestos reaccionan con el agua atmosférica para formar ion nitrato (NO_3^-) e ion sulfato (SO_4^{2-}) que una vez alcanzan el suelo forman sales solubles. De esta manera se solubilizan los cationes del suelo, provocando el empobrecimiento de éste en nutrientes. Esas sales son arrastradas fácilmente a los acuíferos y a los ríos, contaminándolos, lo cual puede dar lugar a un proceso de eutrofización. Ésta afectará finalmente a los embalses, así como a los lagos o mares donde los ríos desemboquen.

En algunos tipos de industria se puede dar la presencia de fósforo en sus vertidos. Por ejemplo, los fosfatos se utilizan en el tratamiento de superficies metálicas para inhibir el proceso de corrosión.

La contaminación urbana. Los efluentes urbanos, si no hay depuración o ésta es sólo parcial, aportan nutrientes en dos formas: a) residuos orgánicos, que enriquecen en elementos previamente limitantes el ecosistema y b) residuos inorgánicos como el fosfato el cual se encuentra en las heces, siendo además un componente de los detergentes.

1.3.2 Consecuencias de la eutrofización

El exceso de nutrientes genera importantes problemas en el medio acuático, entre los cuales es posible citar los siguientes:

- 1) Crecimiento importante de biomasa de fitoplancton, algas asociadas y macrófitas.
- 2) Algunas de las algas que se desarrollan anormalmente producen sustancias tóxicas que pueden matar a los mariscos y peces, hacer que éstos no sean aptos para el consumo humano, dar al agua un sabor desagradable o hacerla inadecuada para el consumo.

3) Disminución del oxígeno disuelto en las aguas profundas, debido a mayores tasas de descomposición bacteriana que consumen el oxígeno disuelto a un ritmo mayor que el de reposición a partir de la atmósfera, de modo que el agua se vuelve menos apta para los peces.

4) Grandes variaciones de oxígeno disuelto entre los períodos de máxima y mínima actividad fotosintética.

Estos problemas conducen a importantes deterioros en el ambiente entre los cuales se pueden mencionar: a) cambios en la fauna acuática, perdurando sólo aquellas especies capaces de resistir las condiciones adversas, b) colmatación y obstrucción de los canales de riego por las algas acuáticas, c) disminución del uso recreativo de embalses y lagos, d) mal olor producido por la descomposición de las algas, e) impedimentos de navegación debido al crecimiento de densas masas de algas en la superficie y f) aumento de los costes del tratamiento de potabilización.

1.3.3 Medidas para evitar la eutrofización

El procedimiento más eficaz para luchar contra este tipo de contaminación es disminuir la cantidad de nutrientes y materia orgánica en los vertidos. Para que esto fuese posible se debería prestar atención a las siguientes pautas:

- Tratar las aguas residuales en estaciones depuradoras que incluyan tratamientos biológicos adecuados que eliminen no sólo la materia orgánica presente sino también el fósforo y el nitrógeno.
- Reducir las emisiones gaseosas y líquidas de NO_x y amoníaco provenientes de la industria. Sus vertidos líquidos pueden tratarse en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) preparada para este tipo de residuo.
- Utilizar los fertilizantes de forma más eficiente, cambiar las prácticas de cultivo a otras menos contaminantes, mantener el suelo con vegetación

para evitar un enriquecimiento en nutrientes y alcancen los cuerpos de agua por lixiviación, evitar vertidos de alta carga orgánica y consecuentemente de nutrientes, etc.

1.4 TRATAMIENTO BIOLÓGICO DEL AGUA RESIDUAL

Una de las finalidades del tratamiento biológico es eliminar la materia orgánica presente en el agua residual. Los microorganismos transforman la materia orgánica coloidal y disuelta en materia floculada y sedimentable, la cual puede ser fácilmente separada del proceso por sedimentación.

Los microorganismos responsables del proceso de depuración se encuentran en forma natural en el agua residual en pequeñas proporciones. Al ingresar al tratamiento biológico se les proporcionan condiciones adecuadas para su proliferación. Para reproducirse y funcionar correctamente, necesitan: i) una fuente de energía, ii) carbono para la síntesis de material celular nuevo y iii) elementos inorgánicos (nutrientes) tales como nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio. De acuerdo a los requisitos nutricionales de los microorganismos, es posible realizar una clasificación de los mismos, la cual se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1: Clasificación de los microorganismos de acuerdo a sus requisitos nutricionales.

Clasificación	Tipo	Fuente de energía	Fuente de Carbono
Autótrofos	Fotoautótrofos	Luz	CO ₂
	Quimioautótrofos	Reacción de Oxidación Reducción inorgánica	
Heterótrofos	Quimioheterótrofos	Reacción de Oxidación Reducción orgánica	Carbono orgánico
	Fotoheterótrofos	Luz	

El principal objetivo de la mayoría de los procesos de tratamiento biológico es la reducción del contenido de materia orgánica del agua residual, con lo cual los microorganismos quimioheterótrofos juegan un papel fundamental

en estos procesos. Estos microorganismos pueden clasificarse de acuerdo a las características de su metabolismo y a sus necesidades de oxígeno molecular. Los microorganismos quimioheterótrofos pueden tener un metabolismo respiratorio o fermentativo. En el primero se genera energía por transporte de electrones mediante enzimas localizadas en la membrana celular desde un dador de electrones hasta un aceptor de electrones exterior. En el metabolismo fermentativo no existe la participación de un aceptor exterior. El sustrato orgánico actúa como aceptor de electrones.

Si el aceptor final de electrones es el oxígeno molecular en el metabolismo respiratorio, el proceso se denomina *respiración aerobia*. Los microorganismos que sobreviven únicamente en ambientes con una suficiente aportación de oxígeno son *aerobios estrictos*. Así también, existen otros compuestos inorgánicos oxidados como el nitrato o el nitrito que pueden actuar como aceptores finales de electrones en el proceso de respiración. Los microorganismos de metabolismo fermentativo a los cuales el oxígeno les resulta tóxico se denominan *anaerobios estrictos*. En cambio, reciben el nombre de *anaerobios facultativos* aquellos microorganismos que pueden crecer en ausencia y presencia de oxígeno.

En función del aceptor final de electrones empleado por los microorganismos pueden generarse diferentes condiciones de operación en el tratamiento biológico del agua residual. Se favorecen condiciones anaerobias si la materia orgánica es el aceptor final de los electrones. En cambio, si los microorganismos emplean aceptores externos es posible trabajar en: a) condiciones anóxicas, si el aceptor es el ión nitrato y b) condiciones aerobias, si el oxígeno es consumido en el proceso de respiración.

Los principales microorganismos que intervienen en el proceso de depuración son los siguientes: bacterias, algas, protozoos, metazoos y hongos. De estos microorganismos las bacterias juegan un papel fundamental en el proceso global de depuración del agua residual. Las mismas son responsables de la eliminación total o parcial de la materia

orgánica biodegradable, y del contenido de fósforo y nitrógeno. A continuación se detallan los procesos de eliminación de contaminantes en los cuales intervienen las bacterias.

1.4.1 Eliminación de materia orgánica

En la degradación de la materia orgánica intervienen numerosas vías metabólicas de las bacterias heterótrofas. Estos procesos ocurren mediante una serie de reacciones sucesivas catalizadas por enzimas. Cada paso es un cambio único, muy específico, que origina un producto el cual será un reactivo en el siguiente paso. Estos procesos metabólicos pueden ser agrupados en dos rutas principales (Boyer, 2000):

CATABOLISMO: En este proceso moléculas orgánicas complejas (grasas, carbohidratos y proteínas) son transformadas en moléculas más simples (lactato, piruvato, etanol, dióxido de carbono, agua y amoníaco). Este es un proceso global de oxidación química y producción de cofactores reducidos: NADH (nicotinamida adenín dinucleótido), NADPH (nicotinamida adenín dinucleótido fosfato), y FADH₂ (flavina adenina dinucleótido), coenzimas transportadoras de electrones. Los procesos catabólicos liberan energía (exotérmicos) que es capturada en el intermediario ATP (adenosin trifosfato). Esta molécula es un transportador universal de la energía bioquímica.

ANABOLISMO: En este proceso se construyen grandes biomoléculas complejas a partir de moléculas precursoras más pequeñas. Algunos de los procesos más importantes incluyen la síntesis de proteínas a partir de aminoácidos, la formación de glucosa a partir de dos moléculas de piruvato y la síntesis de ADN a partir de nucleótidos. El anabolismo normalmente emplea reacciones de reducción y producción de cofactores oxidados NAD⁺, NADP⁺ y FAD. Este proceso requiere energía (endotérmico) y utiliza ATP producido en el catabolismo.

El catabolismo y el anabolismo forman una intrincada red de reacciones coordinadas, las cuales pueden ser agrupadas en tres etapas (Boyer, 2000), ver Figura 1. La etapa I del catabolismo consiste en la degradación de macromoléculas (proteínas, grasas (triacilgliceroles), polisacáridos) en sus respectivos componentes. Las proteínas se hidrolizan en aminoácidos, los triacilgliceroles en ácidos grasos más glicerol y los polisacáridos se hidrolizan en monosacáridos, principalmente glucosa. Todas las reacciones de la etapa I del catabolismo implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos sin liberación de energía útil en forma de NADH o ATP. Esta etapa es la preparación para el siguiente nivel de reacciones, donde los diversos aminoácidos, ácidos grasos y monosacáridos son oxidados en un metabolito común, acetil CoA (etapa II). En la etapa II se libera algo de energía que es capturada en forma de NADH y ATP. En la etapa III, el compuesto acetil CoA ingresa al ***ciclo del ácido cítrico***, donde se oxida a CO₂, el producto final del metabolismo aeróbico del carbono. En la oxidación de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico se producen cofactores reducidos reactivos, NADH y FADH₂, que eventualmente ceden sus electrones. Los electrones son transportados hacia el oxígeno molecular mediante la ***cadena respiratoria***, para que finalmente se produzca energía y agua. La energía liberada en el transporte de electrones está directamente acoplada a la síntesis de ATP a partir de ADP (adenosin difosfato) y fósforo inorgánico. La mayor producción de ATP mediante un proceso denominado ***fosforilación oxidativa*** se desarrolla en la etapa III del catabolismo.

El anabolismo también puede ser dividido en tres etapas, ver Figura 1. Sin embargo a diferencia del catabolismo, las rutas anabólicas son divergentes. La síntesis de monosacáridos y polisacáridos se inicia con oxaloacetato, piruvato o lactato. Los aminoácidos empleados para sintetizar las proteínas se forman a partir de acetil CoA y por aminación de piruvato y α -ceto ácidos del ciclo del ácido cítrico. Los triacilgliceroles se construyen utilizando los ácidos grasos que se originan del acetil CoA. Varios metabolitos como oxaloacetato, acetil CoA y piruvato son precursores comunes de proteínas, triacilgliceroles y polisacáridos. Sin embargo, como se ramifican desde el

principio, se multiplica la síntesis de diversas proteínas, triacilglicerol y polisacáridos. Muchas vías anabólicas requieren energía en forma de ATP y NADPH. Si bien se observa en la Figura 1, que el anabolismo conduce a la producción de macromoléculas, este proceso no es estrictamente lo contrario al catabolismo. Ambos son semejantes por el tipo de intermediarios y enzimas que emplean, pero no son procesos idénticos.

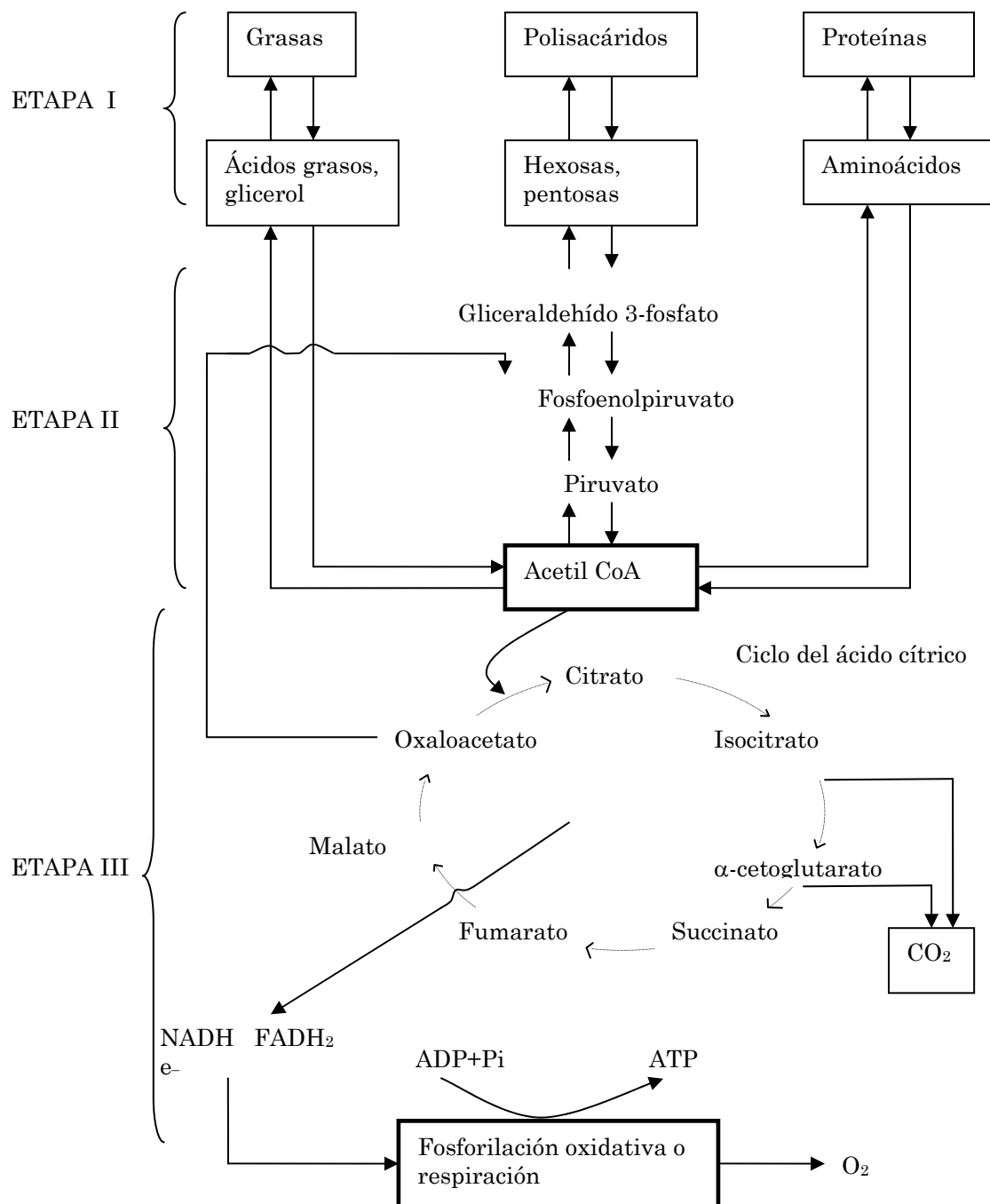


Figura 1: Etapas del Catabolismo y Anabolismo (Boyer, 2000).

1.4.1.1 Regulación de las rutas metabólicas

El metabolismo celular es un proceso regulado para operar con un grado de economía máximo. Este mecanismo regulado permite que la célula pueda adaptarse a cambios que ocurran en su entorno. Las moléculas energéticas se degradan en la célula mediante rutas catabólicas a una determinada velocidad para satisfacer las necesidades de potencial de reducción (NADH) y de fosforilación (ATP). De la misma manera, la actividad biosintética está ajustada para las necesidades celulares de biomoléculas esenciales. Es decir, los microorganismos poseen mecanismos que garantizan el mantenimiento de las necesidades vitales de la célula y al mismo tiempo permiten su crecimiento, si fuera necesario.

Las rutas metabólicas están reguladas por diferentes mecanismos. A continuación se describen dos importantes mecanismos presentes en los microorganismos que participan en el proceso de depuración (Nelson y Cox, 2006):

Regulación de enzimas alostéricas: Este mecanismo tiene una respuesta inmediata. Esta clase de enzima puede cambiar su actividad catalítica en respuesta a moléculas efectoras, estimuladoras o inhibitoras. Se hallan localizadas habitualmente en el comienzo o muy próximos a él, de una secuencia multienzimática y catalizan la etapa limitante de la velocidad, que suele ser irreversible. Por ejemplo, en las rutas catabólicas, que conducen a la producción de ATP, este compuesto producto final de la vía, actúa como un inhibidor alostérico de una etapa inicial del catabolismo. En las rutas anabólicas, el producto biosintético final, como un aminoácido, funciona frecuentemente como un inhibidor de la etapa inicial. Una enzima alostérica en una ruta determinada puede responder específicamente a los intermediarios o a los productos de otras rutas metabólicas. De esta manera pueden coordinarse unas con otras las velocidades de sistemas enzimáticos diferentes.

Regulación por control de la concentración enzimática: La concentración de una enzima en un momento dado es el resultado de un balance entre su velocidad de síntesis y de degradación. La velocidad de síntesis de algunos sistemas se acelera en ciertas condiciones de modo que la concentración real de la enzima en la célula aumenta sustancialmente.

1.4.1.2 Factores que influyen en el crecimiento bacteriano

Para que se desarrollen en forma adecuada las vías metabólicas que intervienen en el proceso de eliminación de materia orgánica es necesario garantizar la presencia de ciertos factores: a) fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, b) fuente de energía, c) iones inorgánicos (principalmente metales como calcio, magnesio, potasio, hierro, manganeso, cobalto, etc.) y d) factores de crecimiento, como las vitaminas.

Las reacciones que intervienen en el metabolismo celular son catalizadas por enzimas. Estos compuestos son muy sensibles a cambios en la temperatura y el pH del medio, lo cual puede generar apreciables variaciones en la velocidad a la cual se desarrollan las reacciones de las vías metabólicas.

1.4.2 Eliminación de nitrógeno

Las rutas biosintéticas que conducen a los aminoácidos y a los nucleótidos comparten la necesidad del nitrógeno. Por lo general, los compuestos solubles de nitrógeno que son biológicamente utilizables escasean en el entorno natural. Por esta razón, la mayor parte de los organismos mantienen una estricta economía en el uso del amoníaco, los aminoácidos y los nucleótidos. Por ejemplo, los aminoácidos libres, las purinas y las pirimidinas formados durante el recambio metabólico a menudo son recuperados y reutilizados.

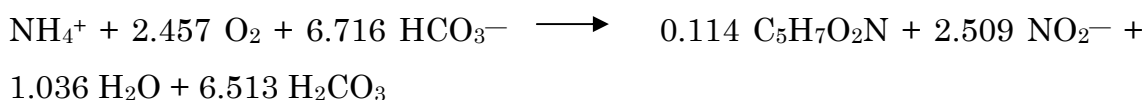
La forma más abundante de nitrógeno se encuentra en el aire, que en sus cuatro quintas partes es nitrógeno molecular (N_2). A pesar de ello, relativamente pocas especies pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas utilizables por los organismos vivos. En la biosfera, los procesos metabólicos de las diferentes especies actúan de forma interdependiente para recuperar y reutilizar el nitrógeno disponible biológicamente en un amplio **ciclo del nitrógeno** (Nelson y Cox, 2006). El primer paso del ciclo consiste en la fijación (reducción) del nitrógeno atmosférico por bacterias fijadoras del mismo para producir amonio (NH_4^+). Aunque el amonio puede ser utilizado por la mayor parte de los organismos vivos, las bacterias del suelo, que obtienen su energía de la oxidación del amoníaco a nitrito (NO_2^-) y finalmente a nitrato (NO_3^-), son tan abundantes y activas que prácticamente todo el amoníaco que alcanza el suelo se oxida a nitrato. Este proceso se conoce como **nitrificación**. Las plantas y muchas bacterias pueden incorporar y reducir fácilmente nitrato y nitrito por acción de las enzimas nitrato y nitrito reductasas. El amoníaco así formado es incorporado a los aminoácidos por las plantas. Los animales usan a su vez las plantas como fuente de aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, para fabricar sus proteínas. Cuando los organismos mueren, la degradación microbiana de sus proteínas devuelve el amoníaco al suelo, donde bacterias nitrificantes lo convierten nuevamente en nitrito y nitrato. Las bacterias que convierten el nitrato en N_2 mantienen un equilibrio entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico, un proceso denominado **desnitrificación**. Estas bacterias del suelo utilizan el nitrato en lugar de oxígeno como aceptor final de electrones en una serie de reacciones que (de la misma manera que la fosforilación oxidativa) generan un gradiente transmembrana de protones que es aprovechado para la generación de ATP.

En el agua residual el nitrógeno se encuentra principalmente en forma de amonio (NH_4^+), el cual es eliminado por medio de la nitrificación y desnitrificación. A continuación se expondrán las reacciones y microorganismos que intervienen en cada una de estas etapas.

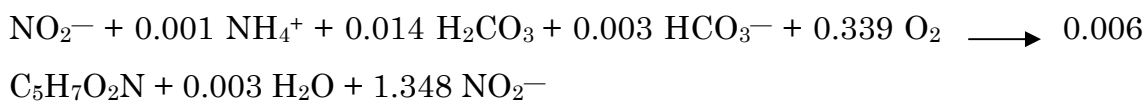
1.4.2.1 Nitrificación

La nitrificación es llevada a cabo por bacterias quimioautótrofas, en condiciones aerobias, es decir emplean el oxígeno como aceptor final de electrones. Dos géneros de bacterias participan en esta etapa: las amonioxidantes, oxidan el amonio a nitrito, y las nitritoxidantes, oxidan el ión nitrito a nitrato. De forma aproximada, las reacciones de síntesis celular que tienen lugar se pueden expresar de la siguiente manera (Grady y col., 1999):

Bacterias amonioxidantes:



Bacterias nitritoxidantes:



$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ indica la composición celular.

1.4.2.1.1 Factores que influyen en el proceso de nitrificación

Diferentes factores ambientales influyen en el proceso de nitrificación, los cuales se mencionan a continuación:

Temperatura: El proceso puede desarrollarse en un intervalo de temperatura comprendido entre 4 y 45°C. Sin embargo, la temperatura óptima para las bacterias amonioxidantes es aproximadamente 35°C y para las bacterias nitritoxidantes el intervalo óptimo de temperatura se encuentra entre 35 y 42°C.

Alcalinidad y pH: En la nitrificación se reduce el nivel de HCO_3^- generando una disminución de la alcalinidad del medio. La mayor proporción de esta

alcalinidad se consume en la neutralización de los protones liberados en la oxidación del ión amonio. Si la alcalinidad del agua residual es insuficiente la disminución del pH puede ser importante. Muchas aguas residuales no tienen capacidad tampón suficiente y el descenso del pH por debajo de 7,0 da lugar a una rápida disminución de la velocidad de nitrificación. El pH óptimo se encuentra entre 7.5 y 8.6 (Metcalf & Eddy, 1995).

Necesidades de oxígeno: Por cada mg de $N-NH_4^+$ (nitrógeno en forma de amonio) oxidado a $N-NO_3^-$ (nitrógeno en forma de nitrato) se necesitan 4.33 mg de O_2 . De los cuales 3.22 mg de O_2 son consumidos por las bacterias amonioxidantes y 1.11 mg de O_2 por las bacterias nitritoxidantes. Las bacterias autótrofas nitrificantes son más sensibles que las heterótrofas a los condicionantes ambientales. Estos microorganismos son estrictamente aerobios, habiéndose observado que concentraciones de oxígeno disuelto inferiores a 1 mg/l conducen a una reducción significativa de la velocidad de crecimiento (Grady y col., 1999).

Tiempo de Retención Celular: La velocidad de crecimiento de las bacterias nitrificantes es menor que la de las bacterias heterótrofas. Es decir, es necesario emplear edades de fango superiores para lograr un buen desarrollo del proceso de nitrificación. Si el proceso contiene alguna etapa no aerobia, la velocidad de muerte de los organismos autótrofos aumenta respecto a la velocidad máxima de crecimiento, aumentando el TRC mínimo para que se produzca la nitrificación.

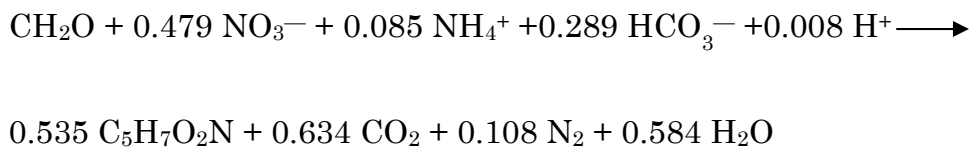
Nutrientes: En todo proceso biológico es necesaria la existencia tanto de nutrientes como de micronutrientes, por lo que se debe verificar que la carencia de alguno de ellos no inhiba el proceso.

Metales pesados: Al ser las bacterias nitrificantes mucho más sensibles que los organismos heterótrofos, es frecuente que se vean afectadas ante cualquier tipo de vertido y cambio en las condiciones de entrada inhibiendo el proceso durante largos períodos de tiempo.

1.4.2.2 Desnitrificación

Esta etapa es realizada por bacterias quimioheterótrofas las cuales en ausencia de oxígeno toman el nitrato presente en el medio transformándolo en nitrógeno gas, producto que es eliminado a la atmósfera. Estas bacterias pertenecen a distintos tipos de géneros, entre las cuales se pueden destacar: *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Spirillum* (Metcalf & Eddy, 1995).

La siguiente ecuación describe la reacción global de desnitrificación empleando un carbohidrato como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno (Grady y col., 1999):



En el proceso de desnitrificación es posible recuperar en parte el gasto energético del aporte de O_2 empleado en la nitrificación. Para la oxidación de 1 g de NH_4^+ se requieren 4.57 g de O_2 . Sin embargo, 1 g de NO_3^- producido tiene la capacidad de aceptar electrones de 2.86 g de O_2 . De esta manera, el 63% del consumo energético requerido para la nitrificación podría ser recuperado (Grady y col., 1999).

En la desnitrificación se consumen H^+ y se produce CO_2 lo cual incrementa la alcalinidad del medio. De acuerdo a la estequiometría de las reacciones, la desnitrificación permite recuperar, aproximadamente, la mitad de la alcalinidad perdida en la nitrificación. Este hecho favorece el control del pH. El intervalo óptimo de pH para el desarrollo de la desnitrificación se encuentra entre 7 y 8.

1.4.2.2.1 Factores que influyen en la desnitrificación:

Entre los factores que influyen en la desnitrificación cabe destacar los siguientes:

Oxígeno disuelto: Una concentración superior a 0.3 – 1.5 mgO₂/l inhibe el proceso de desnitrificación, dado que el oxígeno impide la formación de la enzima nitrato reductasa. Esta enzima es responsable de catalizar la reacción que transforma el nitrato a nitrito.

Relación DBO/Nitrógeno: Se ha observado experimentalmente que existe una correlación entre la capacidad de eliminación de nitrógeno de los procesos de fangos activos y el cociente DBO/NKT, donde DBO es la demanda biológica de oxígeno y NKT es el Nitrógeno Kjeldahl, fracción que contiene el nitrógeno orgánico reducido y el amoniacal. A medida que aumenta esta relación hay mayor disponibilidad de materia orgánica fácilmente biodegradable lo cual permite un desarrollo eficaz del proceso de desnitrificación.

Temperatura: De igual manera que en los procesos biológicos descritos anteriormente, la desnitrificación es afectada notablemente por la temperatura del medio.

pH: El efecto de la desnitrificación sobre el pH del sistema es el opuesto del que produce la nitrificación. La desnitrificación aumenta el pH del medio mientras que la nitrificación lo disminuye. El proceso de desnitrificación tiene un intervalo de pH óptimo de funcionamiento, a pesar de que es menos sensible a las variaciones de pH que el proceso de nitrificación. El valor óptimo para el proceso se encuentra en el intervalo 7-9. A pH bajos (pH<7) el producto final del proceso es N₂O, y a pH superior a 7.3, el producto final es N₂. Dado que el proceso de desnitrificación genera un aumento en la alcalinidad del medio, no se generan problemas graves de inhibición por pH ácidos.

1.4.3 Eliminación de fósforo

El fósforo, principalmente en forma de ciertos tipos de iones fosfato (PO_4^{3-} y HPO_4^{2-}), es un nutriente esencial para vegetales y animales. Forma parte de: i) la molécula de ADN, que contiene la información genética; ii) las moléculas de ATP y ADP, que almacenan energía química para el uso de los organismos en la respiración celular; iii) la membrana plasmática celular, etc.

En el agua residual el fósforo se encuentra principalmente en forma de ortofosfato (PO_4^{3-}) el cual puede ser eliminado por precipitación química o por medio de la actividad biológica de cierto tipo de bacterias en determinadas condiciones de operación. En la sección siguiente se expondrán los mecanismos intervinientes en dicho proceso.

1.4.3.1 Eliminación biológica de fósforo

La eliminación biológica de fósforo se basa en concentrar este elemento en el interior de los microorganismos y eliminarlo con la purga de fango en exceso. Para la mayor parte de los microorganismos, el fósforo representa una pequeña fracción de su peso 1.5 - 2 % (referida a materia seca). Es decir, el crecimiento de la biomasa produce por sí solo un consumo del fósforo presente en el agua residual, dependiendo la cantidad de fósforo eliminado de la producción neta de biomasa. No obstante, si la eliminación de fósforo dependiera únicamente de los requisitos nutricionales bacterianos no sería posible una eliminación completa del contenido de fósforo del agua residual.

Sin embargo, existen determinados microorganismos que pueden asimilar fósforo en proporciones superiores a las correspondientes a los requisitos nutritivos normales, los cuales lo almacenan en forma de gránulos de polifosfatos. Estas son bacterias quimioheterótrofas las cuales se han

denominado organismos acumuladores de fósforo (PAO, *Polyphosphate Accumulating Organisms*).

Las bacterias responsables del proceso de eliminación biológica de fósforo (en inglés: *Enhanced Biological Phosphorus Removal*, EBPR), fueron identificadas mediante técnicas moleculares. Se pudo establecer que la bacteria *Candidatus Accumulibacter phosphatis* perteneciente al grupo *Rhodocyclus*, subclase 2 de las *Betaproteobacterias* se encontraba en gran proporción en fangos biológicos que llevan a cabo el proceso de eliminación de fósforo (Hesselmann y col., 1999). Así también, Saunders y col., (2003) observaron una gran correlación entre el porcentaje de bacterias *Accumulibacter* presentes en el fango biológico y el funcionamiento del proceso EBPR en un estudio realizado en seis plantas en Australia.

Para que ocurra el proceso de eliminación de fósforo es necesario exponer a los microorganismos a la alternancia de dos etapas, la primera en condición anaerobia y la segunda etapa en condición aerobia. A continuación se describirán los mecanismos biológicos característicos de cada etapa.

Etapa Anaerobia:

La primera etapa del proceso de eliminación requiere la ausencia de aceptores de electrones, oxígeno disuelto y nitratos, y la disponibilidad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, como los ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta. Estos AGV, que se encuentran en el agua residual como ácido acético o propiónico principalmente, son almacenados fácilmente por las PAO. Estas bacterias toman y almacenan los AGV en forma de polihidroxialcanoatos (PHA), cuya composición química depende de la fuente de carbono empleada. La energía y el poder reductor necesarios para llevar a cabo el proceso de almacenamiento de PHA son obtenidos de la hidrólisis de los polímeros intracelulares: polifosfatos y glucógeno. La hidrólisis del polifosfato produce un aumento de la concentración de fósforo soluble en el medio y por lo tanto una disminución del pH.

Etapa Aerobia:

Posteriormente a la etapa anaerobia, debe continuar una fase rica en aceptores de electrones, oxígeno o iones nitratos. En esta etapa, el PHA almacenado es metabolizado para generar ATP que permita producir el crecimiento de la población bacteriana, la regeneración de las reservas de glucógeno y el almacenamiento del fósforo soluble en forma de polifosfato (Smolders y col., 1994; Smolders y col., 1995). En esta etapa las bacterias PAO almacenan el fósforo liberado en la etapa anaerobia más el contenido presente en el agua residual. La concentración de fósforo soluble puede alcanzar concentraciones muy bajas (inferior a 1 mg P/L) concentrándose todo el fósforo almacenado en el fango. La importancia de este proceso radica en que las bacterias PAO acumulan más fósforo que el que han liberado. Esta biomasa se separa por decantación y parte de ella es enviada a un posterior tratamiento de fangos (Grady y col, 1999).

1.4.3.2 Metabolismo de la etapa anaerobia

En el proceso anaerobio ocurren numerosas reacciones bioquímicas las cuales pueden ser agrupadas de la siguiente manera:

Transporte del ácido acético a través de la membrana celular: Si bien inicialmente se consideró que el ácido acético se transfiere por difusión pasiva hacia el interior celular, estudios posteriores pusieron de manifiesto que el ácido acético se transfiere mediante un transporte activo. Saunders y col., (2007) lograron inhibir los procesos implicados en el transporte del acetato bajo condiciones anaerobias empleando productos químicos específicos. Este estudio se realizó en un cultivo muy enriquecido en bacterias *Accumulibacter* (PAO) y *Competibacter* (organismo acumulador de glucógeno, GAO). Se llegó a la conclusión que el transporte a nivel de membrana del ión acetato ocurre gracias a la energía contenida en la FPM (fuerza protón motriz). En este estudio se determinó que por medio de la

hidrólisis de los polímeros celulares se genera la energía contenida en la FPM.

Conversión del ión acetato a acetil CoA: Hesselmann y col. (2000), determinaron que la activación del acetato es realizada por la acetil CoA sintetasa que consume 2 mol de ATP por mol de acetato.

Conversión de acetil CoA a PHA: La variedad de AGV presente en el agua residual juega un papel fundamental en la composición química del PHA producido (Pijuan y col., 2004). Las bacterias PAO almacenan el ácido acético preferencialmente como polihidroxibutirato (PHB). En cambio el ácido propiónico es almacenado por estas bacterias principalmente como polihidroxicvalerato (PHV). Puesto que el PHA es un polímero reducido, su síntesis desde acetil CoA requiere poder reductor. Para explicar la procedencia de este poder reductor se han propuesto diferentes modelos metabólicos. A continuación se explicarán brevemente los mecanismos propuestos.

Modelo de Comeau-Wentzel (Comeau et al., 1986; Wentzel et al. 1986): El modelo de Comeau-Wentzel considera que la asimilación del acetato y la oxidación parcial del acetil CoA a través del ciclo del TCA produce el poder reductor necesario para la producción de PHA. Ver Figura 2.

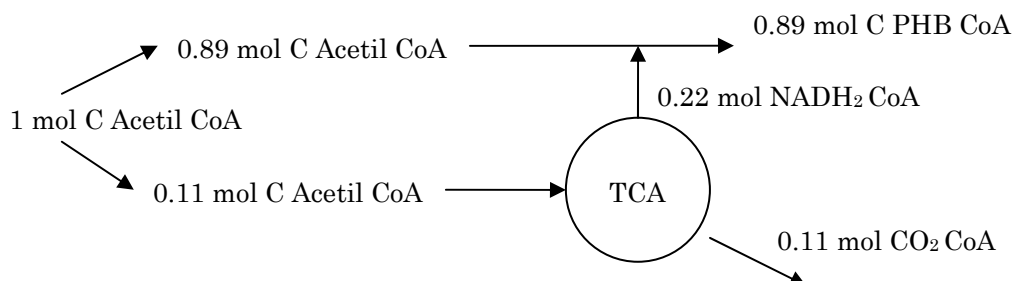


Figura 2: Flujo del carbono y poder reductor según el modelo de Comeau-Wentzel.

Modelo de Mino adaptado (Wentzel y col., 1991; Smolders y col., 1994): En el modelo original de Mino se considera que el poder reductor necesario para la formación de PHA se obtiene de la hidrólisis del glucógeno almacenado intracelularmente. La glucosa generada en la hidrólisis se consume mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la cual se convierte en piruvato y este produce acetil CoA y CO_2 (Figura 3). Observaciones realizadas por Wentzel y col. (1991) sugirieron que la degradación de la glucosa se produce en realidad a través de la vía metabólica Entner-Doudoroff (ED). La modificación al modelo se debe a que el compuesto NAD(P)H_2 es sintetizado mediante la vía ED y no mediante la vía EMP. Además, estos modelos muestran diferencias considerables en los rendimientos de ATP, NADH_2 y NAD(P)H_2 .

Smolders y col., (1994) obtuvieron los siguientes rendimientos en experiencias realizadas en condiciones anaerobias: 0.17 mol C CO_2 /mol C de acetato consumido y 1.33 mol C PHB/mol C de acetato consumido a diferencia del modelo de Comeau-Wentzel que sólo predice 0.89 mol C PHB/mol C de acetato consumido.

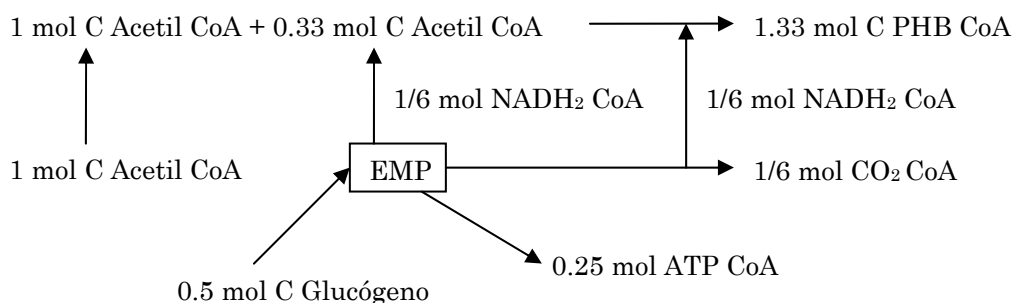


Figura 3: Glicólisis. Modelo de Mino.

Modelo combinado del TCA y la glicólisis: El AGV consumido en la etapa anaerobia se transforma en PHA, el cual es convertido a glucógeno en la etapa aerobia. Cuando el fango biológico vuelve a encontrarse en condiciones anaerobias, el glucógeno almacenado es empleado como fuente de carbono

para la producción de PHA y CO_2 . Sin embargo, el balance redox no se verifica si se desarrolla únicamente la vía de la glicólisis. Por esta razón se han propuesto otro tipo de mecanismos que consideran un funcionamiento parcial del TCA el cual proporcionaría una parte del poder reductor que se quiere para la formación de PHA. Hesselmann y col., (2000), propusieron un mecanismo en el cual el TCA podría funcionar desde el citrato hasta succinil CoA (rama derecha, oxidativa) o desde el oxaloacetato al succinil CoA (rama izquierda, reductora). De esta manera se podría regular la disponibilidad de poder reductor, puesto que el mismo es producido por la rama derecha y consumido por la rama izquierda (Figura 5).

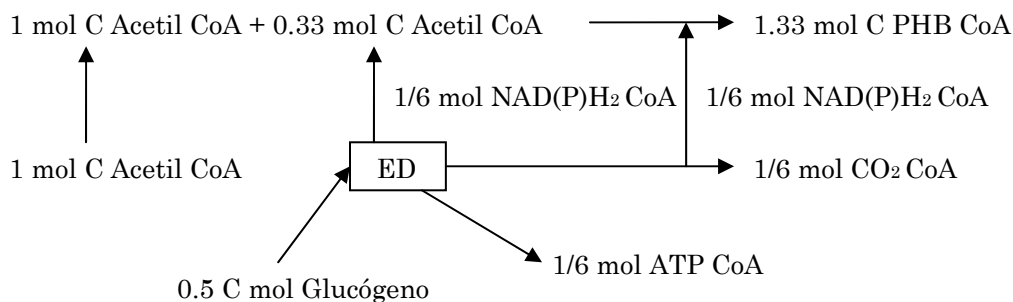


Figura 4: Glicólisis. Modelo adaptado de Mino.

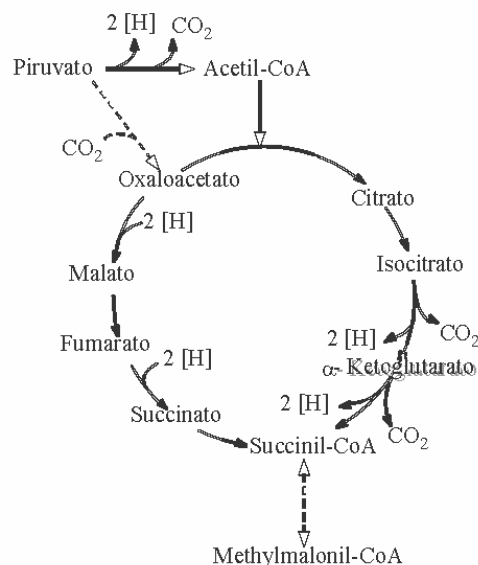


Figura 5: Ciclo del TCA dividido. H: NADH.

1.4.3.3 Metabolismo de la etapa aerobia

Si bien existen notables diferencias entre los metabolismos propuestos para las bacterias PAO en la etapa anaerobia, no ocurre lo mismo en el caso de la etapa aerobia. Las biotransformaciones que ocurren en esta etapa son compartidas por los diferentes modelos propuestos. Los compuestos PHB y PHV son degradados a acetil CoA y propionil CoA, los cuales ingresan al ciclo del TCA a nivel del oxaloacetato y succinil CoA, respectivamente. Estos compuestos son empleados como fuente de energía y carbono para el crecimiento celular, mientras que una parte del ATP sintetizado es empleado en la acumulación de polifosfato. Así también, una parte de la fuente de carbono y energía es empleada en la acumulación de glucógeno. En la Figura 6 se observa un esquema del camino metabólico empleado por las bacterias PAO en condiciones aerobias para la regeneración de glucógeno a partir de PHB.

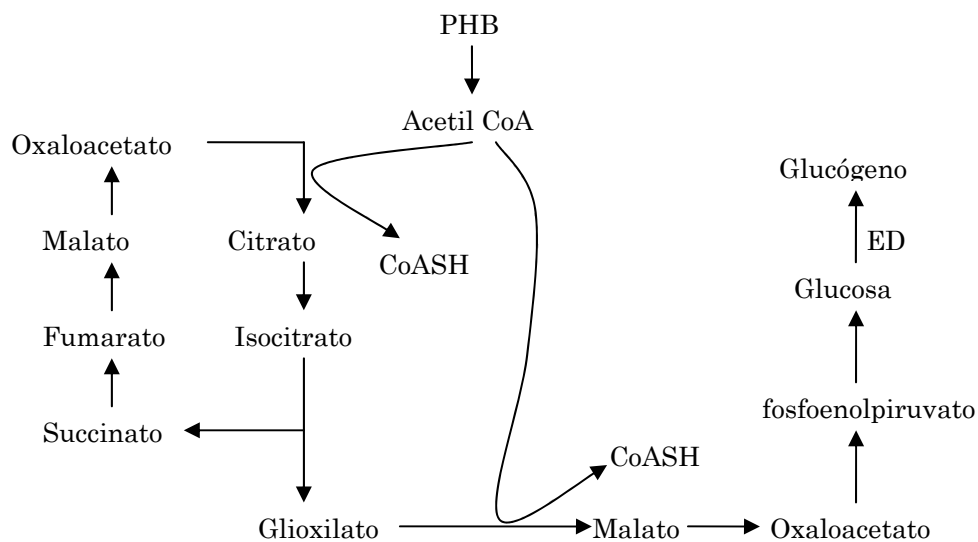


Figura 6: Síntesis de glucógeno a partir de PHB (Wentzel y col., 1991).

1.4.3.4 Eliminación de fósforo en condiciones anóxicas

El proceso de acumulación de fósforo soluble como polifosfato que tiene lugar en condiciones aerobias, también puede desarrollarse en condición anóxica, es decir en presencia de nitratos. Si un fango biológico con una elevada concentración de PHA es sometido a un ambiente anóxico, ocurre simultáneamente una acumulación del fósforo soluble y una desnitrificación. Estos procesos se desarrollan dado que una porción de las bacterias PAO (DPAO) puede emplear iones nitrato o nitrito como aceptor de electrones en lugar de oxígeno. El proceso anóxico de acumulación de fósforo presenta una menor eficiencia en la producción de energía, un 40% menor al mismo proceso en condiciones aerobias (Kuba y col., 1996). Este proceso resulta atractivo desde el punto de vista económico dado que se reduce el costo asociado al consumo de oxígeno. Además, la menor eficiencia en la generación de energía conduce a un menor rendimiento del crecimiento celular, en el orden de un 20-30% más bajo, con lo cual se reduce la producción de fangos.

Se ha intentado establecer si las bacterias PAO son capaces de desarrollar ambos procesos. Carvalho y col., (2007) realizaron estudios en dos reactores SBR (*sequencing batch reactor*), uno alimentado con ácido acético y otro con ácido propiónico. Gradualmente se cambió el modo de operación de ambos reactores de anaerobio-aerobio a anaerobio-anóxico. Se observó que el SBR alimentado con ácido propiónico pudo mantener el proceso de desnitrificación después de la aclimatación, mientras que no pudo mantenerse la actividad biológica en el reactor alimentado con ácido acético después de eliminar la fase aerobia. La caracterización microbiana empleando la técnica FISH (*fluorescent in situ hybridization*) reveló que *Accumulibacter* era el organismo dominante en cada reactor, aunque en el reactor alimentado con ácido acético se halló predominantemente un morfotipo en forma de coco, mientras que en el reactor alimentado con ácido propiónico se encontró que estaba enriquecido con un morfotipo en forma de bacilo. Se presume que la célula en forma de coco corresponde a una cepa de

Accumulibacter que es incapaz de utilizar el nitrato como aceptor de electrones pero puede utilizar el oxígeno, y posiblemente el nitrito. La célula con forma de bacilo se considera que es una bacteria PAO capaz de utilizar el nitrato, el nitrito y el oxígeno.

1.4.3.5 Bacterias GAO en el proceso biológico

En determinadas condiciones de operación se ha observado la presencia de bacterias quimioheterótrofas que compiten con las bacterias PAO por los ácidos grasos volátiles en condiciones anaerobias. Sin embargo, estas bacterias, no son capaces de acumular polifosfato, es decir no participan en el proceso de eliminación de fósforo. Dado que estas bacterias emplean el glucógeno como principal fuente de energía, se han denominado organismos acumuladores de glucógeno (GAO, *Glycogen Accumulating Organisms*).

El piruvato, compuesto intermedio de la glucólisis, ingresa al ciclo del TCA a nivel del oxaloacetato para ser transformado en succinil CoA y posteriormente a propionil CoA. De esta manera, cuando las bacterias GAO consumen ácido acético, producen acetil CoA y propionil CoA. Esto genera una gran diferencia con las PAO en relación a la composición del PHA producido. Las bacterias PAO producen principalmente PHB cuando se alimentan de ácido acético, con una pequeña producción de PHV (generalmente < 10%, base C-mol) (Mino y col., 1998). Sin embargo, las bacterias GAO producen aproximadamente 75% PHB y 25% PHV (base mol C) cuando se alimentan de acetato (Zeng y col., 2003).

El metabolismo aerobio de las bacterias GAO es similar al de las PAO, sin la acumulación de polifosfato. La oxidación tanto de PHB como de PHV produce la energía necesaria para el crecimiento celular, producción de glucógeno y el mantenimiento celular.

Empleando técnicas FISH se logró identificar a la población de bacterias GAO la cual fue denominada *Candidatus Competibacter phosphatis* (*Competibacter*) (Crocetti y col., 2002).

1.4.3.6 Factores que influyen en el proceso de eliminación de fósforo

El funcionamiento adecuado del proceso EBPR depende de numerosos factores operacionales. Entre ellos debe destacarse la competición microbiana entre bacterias GAO y PAO. Por esta razón, a continuación se expondrán los principales factores que afectan el proceso EBPR, considerando en los que corresponda si los mismos pueden fomentar el desarrollo de bacterias GAO en el proceso.

Disponibilidad de sustrato: Un buen desarrollo del proceso de eliminación de fósforo está vinculado a la presencia en el agua residual de AGV. En el agua residual estos compuestos se encuentran en mayor proporción como ácido acético y ácido propiónico. Sin embargo, la concentración total de los mismos depende del proceso de fermentación que pueda desarrollarse en el sistema de alcantarillado y posteriormente en la etapa anaerobia de la planta de tratamiento biológico. Si la concentración no es suficiente, puede ser necesario agregar AGV antes del tratamiento biológico.

Fuente de carbono: El empleo de ácido acético como fuente del carbono posibilita un funcionamiento estable y robusto de los sistemas de EBPR. Sin embargo, en determinadas ocasiones se ha observado una proliferación de bacterias GAO en sistemas EBPR. La presencia de bacterias GAO en el sistema puede verse reflejada en los valores que tome la relación fósforo liberado/ácido graso consumido. Valores bajos están relacionados a una concentración pobre de *Accumulibacter* y elevada concentración de bacterias GAO. Estudios recientes han sugerido que el ácido propiónico puede favorecer la eliminación biológica de fósforo. En reactores de laboratorio alimentados con propiónico como única fuente de carbono, se determinó que

la población dominante estaba conformada por la bacteria *Accumulibacter*, con ausencia total de bacterias *Competibacter* (Pijuan y col., 2004).

Nitratos: La presencia de nitratos en la etapa anaerobia puede conducir a una variación importante en las condiciones de operación de anaerobia a anóxica. De esta manera las bacterias heterótrofas desnitrificantes podrían consumir el sustrato fácilmente biodegradable destinado a las bacterias PAO. Esto conduciría a una reducción de la eficiencia del proceso el cual podría llegar a inhibirse.

Tiempo de Retención Celular (TRC): García-Usach (2002) halló evidencia experimental respecto a la influencia del TRC en el desarrollo de bacterias GAO en el sistema. TRC altos fomentan el crecimiento de estas bacterias en el fango biológico.

Whang y col., (2007) determinaron que en edades de fango bajas las bacterias PAO pueden dominar el proceso. En condiciones en las cuales el consumo del ácido acético por parte de las bacterias PAO es menor o similar al realizado por las bacterias GAO, estas últimas pueden almacenar una mayor cantidad de X_{PHA} en condiciones anaerobias, pero producir una menor proporción de biomasa en condiciones aerobias. Estos autores observaron que las bacterias PAO optimizan la distribución del polihidroxialcanoato en condiciones aerobias destinando una mayor proporción de X_{PHA} para crecimiento que las bacterias GAO. Estas emplean el glucógeno como única fuente de energía para el consumo de ácido acético, con lo cual deben regenerar este polímero en condiciones aerobias. De esta manera destinan una menor proporción del polímero X_{PHA} para el crecimiento. El comportamiento de las bacterias GAO es problemático cuando se opera con un TRC bajo. En estas condiciones las bacterias acumuladoras de fósforo presentan una clara ventaja respecto a los microorganismos acumuladores de glucógeno.

Relación materia orgánica/fósforo (DQO/ P_T) en el agua residual: El contenido de fósforo que ingresa al tratamiento biológico puede resultar

limitante si el contenido de materia orgánica es superior al necesario para eliminar todo el fósforo. De este modo, la relación DQO/P_T en el influente de un proceso de eliminación biológica de fósforo marcará el grado de eficacia de dicho proceso.

La relación DQO/P_T también afecta la competencia entre bacterias PAO y GAO. Liu y col., (1997) determinaron que un aumento de esta relación favorece el crecimiento de bacterias GAO.

Efecto del pH: Smolders y col., (1994) determinaron que la proporción de fósforo liberado en condición anaerobia varía linealmente de 0.25 a 0.75 mol P/mol C para un aumento pH de 5.5 a 8.5. Sin embargo, el consumo de acético, la degradación de glucógeno y la acumulación de PHA no dependen del pH en el intervalo de 6.5 a 8.0. En la etapa aerobia, se determinó que el consumo de fósforo, la utilización de PHA y el crecimiento de la biomasa son inhibidos a pH inferior a 6.5, siendo más beneficioso para las bacterias PAO un pH aerobio más alto (7-7.5) (Filipe y col., 2001b).

Por el contrario, el aumento de pH genera una disminución en la velocidad de consumo de acético de las bacterias GAO, y un incremento en el consumo anaerobio de las reservas de glucógeno y en la acumulación de PHV. Esto sugiere que un aumento en el pH resulta en una mayor demanda de energía para el consumo de acético afectando negativamente al metabolismo de las bacterias GAO.

Temperatura: Se ha observado que la temperatura tiene un efecto muy marcado en el consumo de ácido acético que llevan a cabo las bacterias PAO y GAO en condiciones anaerobias, el cual se cree es uno de los factores que más condicionan la competencia existente entre estas bacterias. Whang y Park, (2006), a partir de estudios en un reactor discontinuo, observaron que al aumentar la temperatura entre 10 y 20°C se incrementa prácticamente en igual medida el consumo de acético de las bacterias GAO y de las PAO en condiciones anaerobias. Sin embargo, al incrementar la temperatura entre

20 y 30 °C disminuye ligeramente el consumo de acético de las bacterias PAO y prácticamente se duplica el de las bacterias GAO.

1.4.4 Fermentación

La materia fácilmente biodegradable puede ser consumida mediante el proceso de fermentación en condiciones anaerobias. Los productos de este proceso, denominado *acidogénesis*, son ácidos orgánicos (acético, propiónico, butírico, láctico), compuestos neutros (etanol, metanol), amoníaco, hidrógeno y dióxido de carbono. La producción de hidrógeno en estas reacciones es pequeña y se produce mediante reacciones de deshidrogenación.

La acidogénesis presenta una gran utilidad en el tratamiento biológico del agua residual dada la posibilidad de generar AGV. Este proceso permitiría aumentar la disponibilidad de estos compuestos para que los mismos sean consumidos por las bacterias PAO.

Los microorganismos responsables del proceso de acidogénesis son las bacterias acidogénicas, las cuales tiene la capacidad de convertir la materia orgánica fácilmente biodegradable en ácidos grasos de cadena corta principalmente en ácido acético y propiónico. En menor proporción también se producen otros ácidos volátiles tales como el ácido valérico y el ácido butírico.

En el proceso de *fermentación de azúcares* los monómeros de carbohidratos son fermentados prioritariamente a piruvato. Por ejemplo, la glucosa (hexosa) genera dos moléculas de ácido pirúvico. Este compuesto ocupa una posición clave en el metabolismo celular. La presencia o no de oxígeno es el factor principal que determina el destino del ácido pirúvico. Cuando no se dispone de oxígeno, otras moléculas deben aceptar los electrones para oxidar el NADH_2 a NAD^+ y que pueda continuar el metabolismo. El producto obtenido depende del mecanismo utilizado por las diferentes bacterias para degradar

el piruvato. En la Figura 7 se presentan los compuestos que pueden ser producidos a partir de piruvato en condiciones anaerobias.

En la *fermentación de aminoácidos* los productos obtenidos son generalmente amonio, dióxido de carbono, hidrógeno, ácido acético y ácido butírico, pudiéndose formar, en función del aminoácido fermentado, ácido propiónico, otros ácidos de bajo peso molecular y etanol. La fermentación de los aminoácidos se realiza principalmente mediante tres procesos:

1) Reacciones de *oxidación-reducción* entre pares de aminoácidos, que son metabolizados conjuntamente, dando lugar a diferentes productos intermedios (AGV) en función del aminoácido de partida. Este mecanismo de fermentación permite que los aminoácidos que no pueden ser fermentados individualmente puedan ser usados como fuente de energía. Un ejemplo de este tipo de proceso es la denominada reacción de Stickland en la cual la alanina se oxida y la glicina se reduce, produciendo ambas ácido acético.

2) Reacciones de *desaminación/transaminación* de aminoácidos alifáticos, en las que el grupo amino del carbono α del aminoácido es transferido a otra cadena carbonada, generando ácido pirúvico y una amina. Posteriormente, este ácido pirúvico se incorpora al ciclo glucolítico generando AGV.

3) Reacciones de *oxidación anaerobia* de un solo aminoácido empleando hidrógeno o dióxido de carbono como aceptor externo de electrones.

Una de las características del proceso de fermentación es que la demanda química de oxígeno (DQO) del sistema no cambia significativamente porque la mayor parte de los electrones presentes en la materia orgánica original continúan en otros compuestos orgánicos. Únicamente la desabsorción del hidrógeno formado disminuye la DQO del sistema. Otra característica del proceso es la disminución significativa del pH debida a la producción de ácidos volátiles. El pH puede disminuir hasta valores próximos a 6 o incluso inferiores, en función de la alcalinidad del agua y de las condiciones de operación. El valor del pH afecta la actividad de las bacterias acidogénicas.

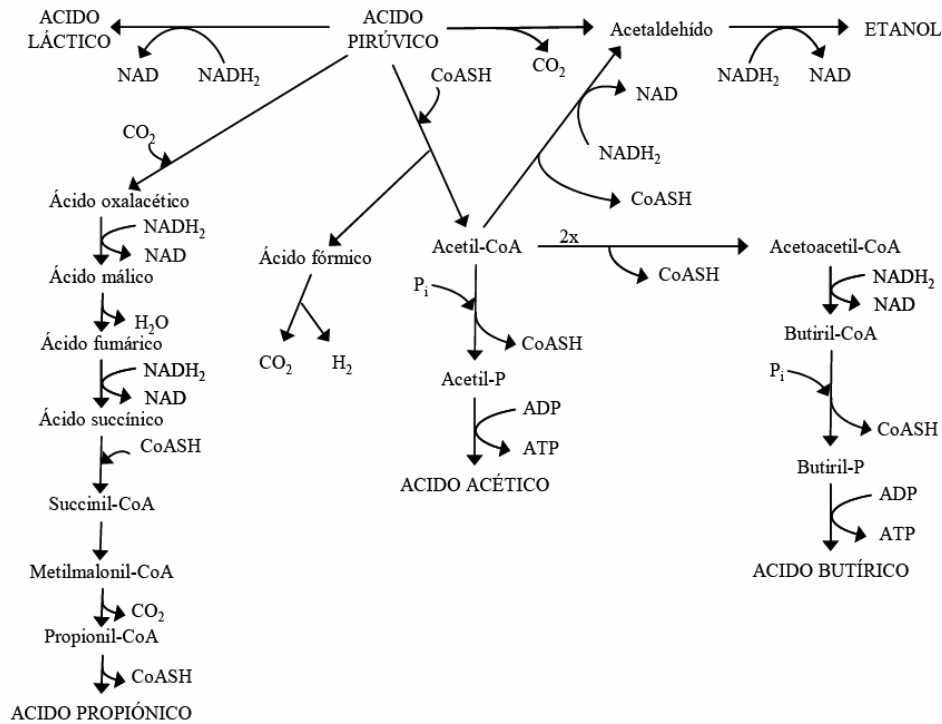


Figura 7: Destino del ácido pirúvico.

La importancia observada del proceso de acidogénesis es la posibilidad de generar una mayor concentración de AGV en la etapa anaerobia del sistema de depuración. En particular, una mayor presencia de ácido acético y propiónico podría incorporar un factor más a considerar en el proceso de eliminación biológica de fósforo.

1.5 PROCESO DE FANGOS ACTIVADOS

En la actualidad, los requisitos de vertido conducen a proyectar plantas de tratamiento de aguas residuales que incluyan procesos de eliminación simultánea de materia orgánica, fósforo y nitrógeno. Los procesos de eliminación de nutrientes son más complejos que los de eliminación de materia orgánica. Así, tanto para la eliminación de nitrógeno como para la de fósforo son necesarias al menos dos etapas: aerobia y anóxica para el caso del nitrógeno y anaerobia y aerobia para el caso del fósforo. Los procesos de

eliminación de ambos nutrientes requieren de al menos tres etapas: anaerobia, anóxica y aerobia.

Teniendo presente las restricciones que se puedan imponer al vertido, existe un conjunto de situaciones en las cuales puede resultar adecuado un tratamiento biológico de eliminación de materia orgánica y nitrógeno o de materia orgánica y fósforo.

De esta forma, los procesos de eliminación de materia orgánica y nitrógeno se aplican cuando:

- 1- La concentración de fósforo en el agua residual es baja.
- 2- Se selecciona un método físico-químico para la eliminación de fósforo.
- 3- Los requisitos de vertido obliguen a la nitrificación, ya que la desnitrificación, normalmente, supone un ahorro de energía al utilizarse los nitratos para la oxidación de la materia orgánica y reducirse por tanto las necesidades de aireación.

Los procesos biológicos de eliminación conjunta de materia orgánica y fósforo pueden diseñarse cuando, no existiendo una restricción para el vertido de nitrógeno, la utilización posterior del agua haga necesaria la eliminación de fósforo.

Los procesos de eliminación conjunta de materia orgánica y ambos nutrientes suelen ser sistemas de cultivo simple y en suspensión. En los sistemas de cultivo simple, el mismo cultivo biológico realiza todos los procesos biológicos involucrados: eliminación de materia orgánica, nitrificación, desnitrificación y eliminación de fósforo. En los sistemas de cultivo en suspensión, los microorganismos reponsables del tratamiento biológico se mantienen en suspensión dentro del líquido. Este sistema de tratamiento, denominado fangos activados, es el más ampliamente utilizado para el tratamiento secundario de las aguas residuales.

Desde el punto de vista del funcionamiento, el tratamiento biológico de aguas residuales mediante fangos activados se suele llevar a cabo utilizando un diagrama de flujo como el de la Figura 8. El **influyente** (agua residual a depurar), se introduce en el reactor el cual contiene un cultivo bacteriano en suspensión. El influente permanece en el reactor un período **tiempo de retención hidráulico** (TRH), durante el cual la masa bacteriana elimina la materia orgánica, el nitrógeno y el fósforo contenidos en el mismo. El licor mezcla se conduce a un **sedimentador** o **decantador secundario** en el cual se produce la separación del sobrenadante o **efluente** y el precipitado o fango. Este se recircula al reactor para mantener una concentración adecuada de microorganismos. Una parte del fango se elimina del sistema para compensar el crecimiento de los microorganismos (**purga**) y mantener de esta manera el **tiempo de retención celular** (TRC) o edad media del fango deseado.

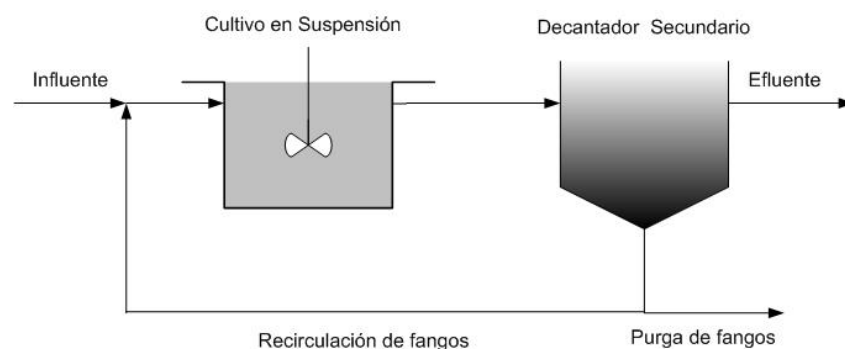


Figura 8: Esquema básico del proceso de fangos activados.

Para una eliminación conjunta de materia orgánica, fósforo y nitrógeno el esquema de la Figura 8 debe ser modificado. Para lograr este propósito el licor mezcla debe permanecer un cierto tiempo en diferentes compartimentos, cada uno de los cuales presentan distintas condiciones de operación: anaerobia, anóxica y aerobia. Estas tres etapas han sido combinadas en diversos esquemas.

Los esquemas de proceso existentes se pueden clasificar en: 1) A²/O y derivados y 2) Secuenciales de alimentación alternativa.

1.5.1 Esquema A²/O y derivados

El esquema más sencillo que permite la eliminación biológica de nitrógeno y fósforo es el A²/O, que consiste en una secuencia de tres etapas anaerobia-anóxica-aerobia con una corriente de recirculación (recirculación interna o de nitratos) que va del reactor aerobio al anóxico. En el reactor anaerobio se consume el contenido de AGV del agua residual, con el consiguiente incremento en la concentración de ortofosfatos en el medio por la actividad de las bacterias PAO. En la zona anóxica ingresa una corriente rica en nitratos desde la etapa aerobia. Estos aceptores de electrones son utilizados por: i) las bacterias heterótrofas desnitrificantes que consumen la materia orgánica, y ii) las bacterias PAO desnitrificantes que acumulan el fósforo soluble como polifosfato. En la etapa aerobia ocurre el consumo de la materia orgánica que no ha sido degradada en el reactor anaerobio o con nitratos en la segunda etapa. Además, en la zona aerobia se produce la nitrificación y la acumulación del fósforo soluble en forma de polifosfatos por parte de las bacterias PAO aerobias. En el proceso A²/O el fango activado sedimentado en el decantador secundario se recircula al inicio de la etapa anaerobia. La desventaja de recircular todo el lodo a la zona anaerobia es que el nitrato generado en la etapa aerobia puede promover la utilización de ácidos grasos volátiles para la desnitrificación, en lugar de ser almacenado como PHA por las bacterias PAO. En la Figura 9-A se muestra este esquema.

Existe una gran variedad de esquemas de proceso derivados del A²/O. Así, la configuración UCT (University of Cape Town), Figura 9-B, se diferencia del esquema A²/O en la diferente disposición de las corrientes de recirculación, tanto la de fangos como la interna. La corriente de fangos que proviene del decantador secundario se introduce en el reactor anóxico. Los nitratos producidos en la zona aerobia son dirigidos al reactor anóxico a través de la corriente de recirculación interna. Este esquema proporciona condiciones anaerobias más estrictas en el primer reactor permitiendo un mejor desarrollo de la eliminación de fósforo. En el esquema UCT se debe optar

por un valor de la corriente de recirculación interna que haga que la concentración de nitratos en el reactor anóxico sea baja. En caso contrario, este aceptor de electrones aparecería en el reactor anaerobio, con lo cual la ventaja de este proceso sobre el esquema A²/O desaparecería. Si se trabaja de la forma indicada se produce una limitación en la capacidad de eliminación de nitrógeno del sistema. Este inconveniente desaparece si se divide la etapa anóxica en dos. Este nuevo esquema se denomina UCT modificado (Figura 10-A). Este esquema presenta una división de la zona anóxica en dos secciones, uno para la desnitrificación de los nitratos provenientes de la recirculación de fangos y el otro para la desnitrificación de los nitratos que son recirculados desde la zona aerobia del proceso. La primera zona anóxica asegura una completa desnitrificación de los nitratos provenientes de la recirculación de fangos. El licor mezcla de esta sección es recirculado a la etapa anaerobia la cual consigue mejorar la utilización de la materia orgánica en esta etapa. De esta manera se consigue una condición anaerobia más estricta.

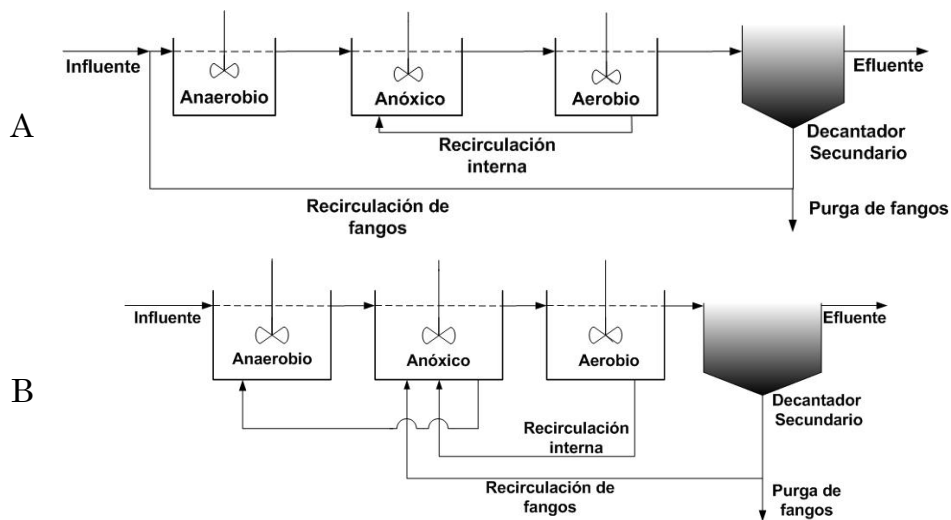


Figura 9: Esquemas (A) A²/O y (B) UCT.

Una alternativa al proceso UCT es el proceso JHB (Johannesburg), Figura 10-B. En este esquema el tanque anóxico en el cual se eliminan los nitratos de la corriente de recirculación de fangos, es exterior a la línea principal de

tratamiento. La elevada concentración de fango en este reactor anóxico permite obtener un buen grado de desnitrificación por utilización de la biomasa endógena.

El esquema de proceso ISAH (Institut für Siedelugswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover) es muy parecido al JHB, caracterizándose por la existencia de una etapa anóxica a través de la cual se hace pasar la corriente de recirculación de fangos, Figura 10-C. Con esto se consigue disminuir la cantidad de nitrógeno oxidado que llega al reactor anaerobio. La principal diferencia con el anterior proceso es la existencia de una corriente que, en caso de que el grado de desnitrificación en el reactor anóxico no sea el adecuado, aporta parte del efluente del reactor anaerobio con el objetivo de incrementarlo.

Otro esquema derivado del A²/O es el BARDENPHO de cinco etapas, ver Figura 10-D. Este proceso consta de dos etapas más: una anóxica y una aerobia. La doble secuencia anóxica-aerobia permite mejores rendimientos en la eliminación total de nitrógeno y presenta las siguientes ventajas:

- 1- Elimina por arrastre el nitrógeno gaseoso, dotando así al fango de una mejor sedimentabilidad.
- 2- El fango presenta un exceso de oxígeno que impide las condiciones anaerobias en el decantador secundario. Esto evita una posible liberación de fósforo en esta etapa debido al consumo de materia orgánica procedente de la biomasa endógena.
- 3- Este esquema trabaja con elevados TRC y de todos los que permiten la eliminación conjunta de nitrógeno y fósforo, consigue los mayores rendimientos de eliminación de nitrógeno.

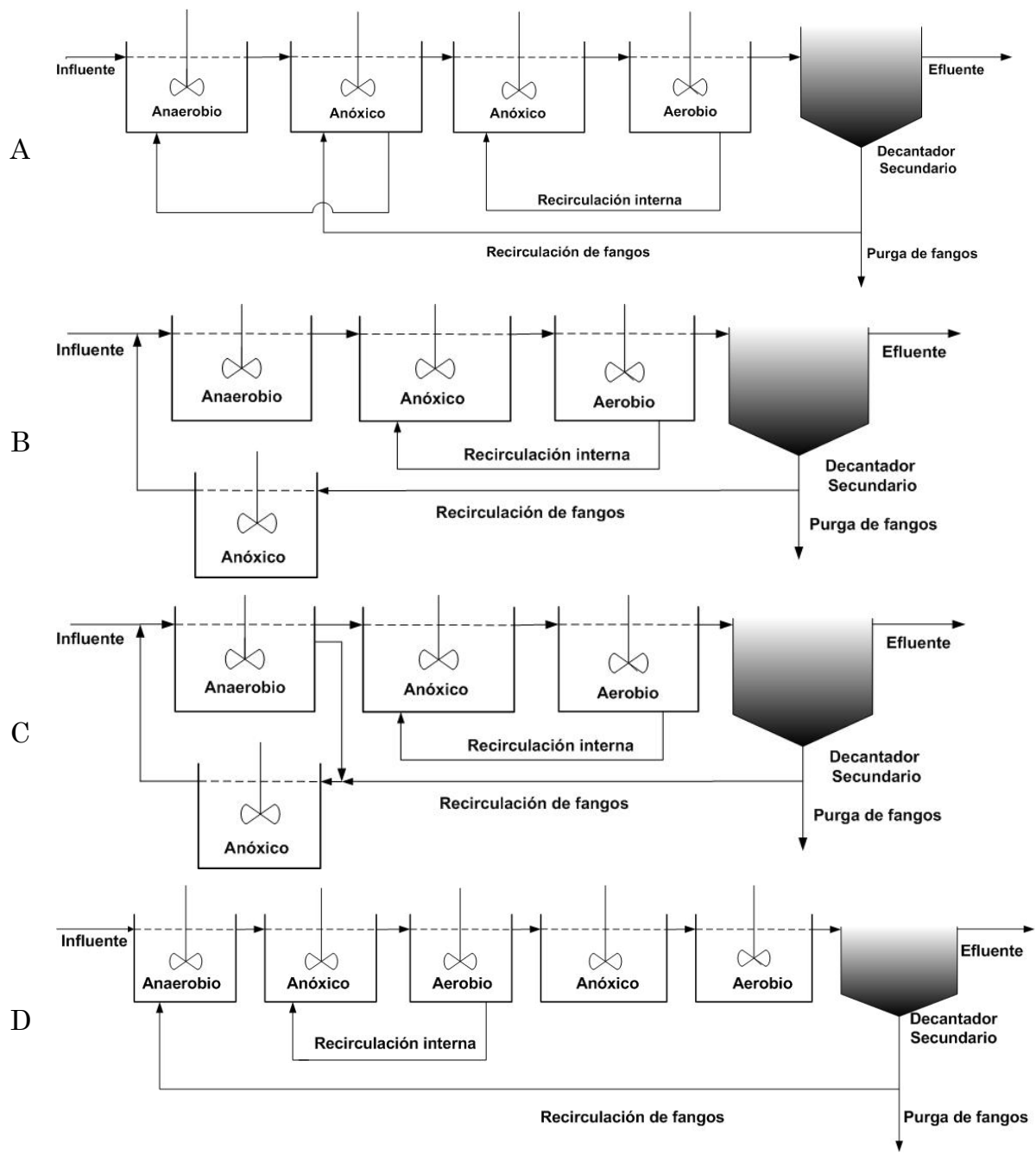


Figura 10: Esquemas: (A) UCT modificado, (B) JHB, (C) ISAH y (D) BARDENPHO.

1.5.2 Esquemas secuenciales de alimentación alternativa

En estos procesos la entrada o influente del tratamiento biológico es continua, pero las etapas funcionan en régimen discontinuo. Un ejemplo de este tipo de esquemas es el BIODENIPHO el cual permite eliminar en forma

continua fósforo y nitrógeno, ver Figura 11. Los procesos de nitrificación y desnitrificación se llevan a cabo en dos reactores cuyas condiciones se invierten en cada fase del proceso de forma secuencial, mediante el encendido y apagado de la aireación. El flujo de caudal a través de ellos y su aireación se ajustan para establecer las zonas de nitrificación y desnitrificación periódicamente en el reactor, donde se encuentran el amonio y los nitratos respectivamente. Además, se observa que la etapa anaerobia funciona en forma continua. Este sistema presenta las siguientes ventajas: a) no requiere una corriente de recirculación interna, b) se elimina la posible necesidad de un tanque de homogeneización y c) es flexible, dado que es posible modificar el tamaño de las etapas de nitrificación y desnitrificación.

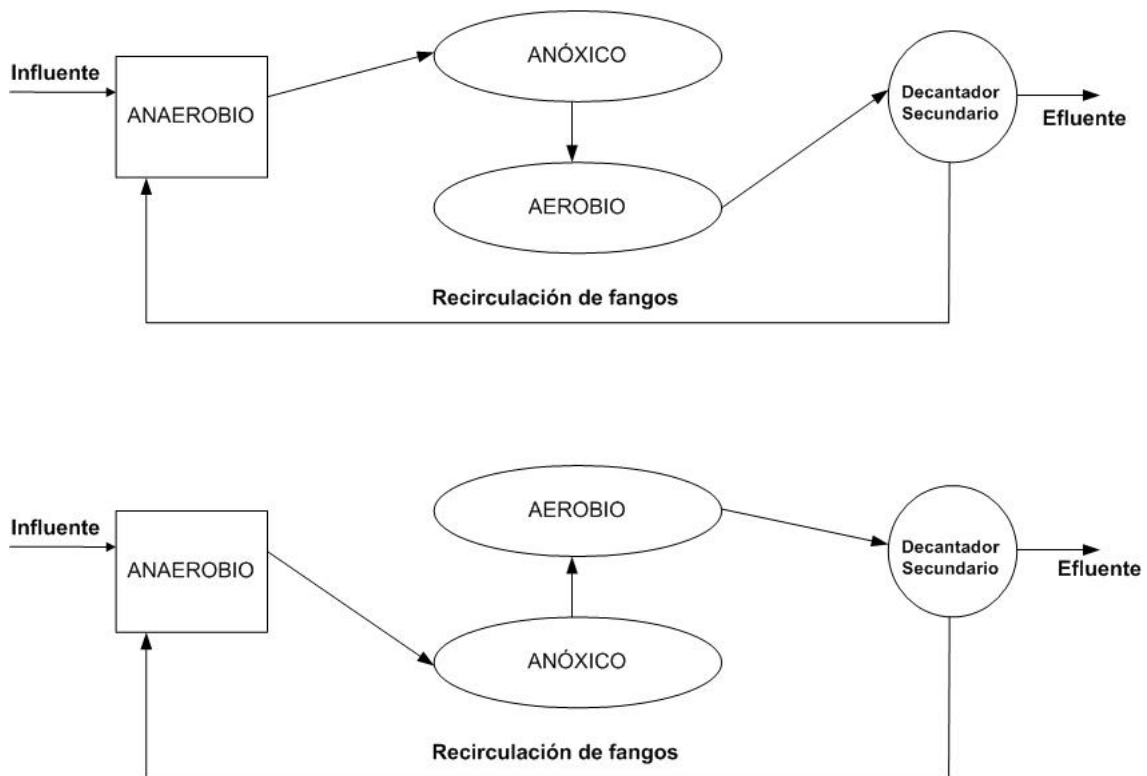


Figura 11: Esquema BIODENIPHO.

1.6 MODELACIÓN MATEMÁTICA DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS

El desarrollo de un modelo matemático sirve para describir el comportamiento actual y previsible de un proceso mediante unas bases teóricas bien establecidas. Al realizar la modelación se lleva a cabo un gran esfuerzo por conocer, primero de forma cualitativa y después cuantitativa, el sistema, asignando un sentido físico para cada parámetro y estudiando su efecto por separado, los cuales tendrán una interacción combinada sobre el proceso global. De este modo un modelo matemático es un conjunto de ecuaciones matemáticas que permiten describir el comportamiento de un proceso, basadas en unas claras formulaciones teóricas a partir de conceptos básicos.

En un principio la modelación de los sistemas de tratamiento de aguas residuales sólo consideraba al proceso de eliminación de materia orgánica. Con el paso del tiempo se incorporaron los procesos de eliminación de nitrógeno y fósforo. Debido a las interacciones que ocurren dentro de estos sistemas los modelos matemáticos que los representan suelen ser muy complejos por lo que hasta hace unos años eran de escasa utilidad.

Considerando que en estos sistemas se obtienen grandes beneficios con el uso de modelos matemáticos, la Asociación Internacional del Agua, IWA (anteriormente IAWPRC), formó un grupo de trabajo en 1983 para promover el desarrollo y aplicación de modelos prácticos para el diseño y simulación de sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales. El primer objetivo fue revisar los modelos existentes y después llegar a un acuerdo sobre el más sencillo con la capacidad de predecir acertadamente el desarrollo de un sistema de fangos que comprendiera oxidación carbonosa, nitrificación y desnitrificación. Como resultado de ese trabajo, propusieron el Activated Sludge Model No. 1 (ASM1) (Henze y col., 1987) el cual ha demostrado ser una herramienta muy útil para la investigación, desarrollo y optimización de los procesos biológicos de eliminación de nitrógeno. La implementación de

este modelo ha conducido a desarrollar metodologías adecuadas de caracterización del agua residual para identificar las distintas componentes de la misma.

La experiencia que el grupo de trabajo de la IAW obtuvo con el ASM1 sirvió de base para desarrollar un nuevo modelo, el Activated Sludge Model No. 2 (ASM2) (Henze y col., 1995) diseñado para simular la eliminación biológica de la materia orgánica, del nitrógeno y del fósforo en los procesos de fangos activados. Sin embargo, el ASM2 no consideraba la desnitrificación por parte de las bacterias PAO. Después de la publicación de dicho modelo se demostró claramente que estas bacterias eran capaces de utilizar nitratos como aceptor de electrones. Por lo que fue necesario considerar dos fracciones de bacterias PAO, una de las cuales tiene la capacidad de desnitrificar. Esto dio lugar a realizar una extensión del modelo ASM cuyo resultado fue el ASM2d (Henze y col., 1999).

El grupo de investigación CALAGUA ha avanzado en la modelación de los procesos que ocurren en una EDAR mediante la propuesta del modelo Biological Nutrient Removal Model No. 1 BNRM1 (Seco y col., 2004). Se ha propuesto un único modelo que permite representar los procesos físicos, químicos y biológicos más importantes que tienen lugar en las estaciones depuradoras. Por lo tanto, el modelo BNRM1 puede utilizarse para diseñar y simular todas las operaciones básicas de una EDAR, permitiendo tener en cuenta los efectos combinados de los diferentes procesos de tratamiento. De esta forma el funcionamiento global de la EDAR puede ser optimizado.

Los procesos físicos considerados por el modelo BNRM1 son: sedimentación y clarificación (sedimentación floculada, zonal y compresión), elutriación de los ácidos grasos volátiles y procesos de transferencia de materia entre las fases líquida y gaseosa. Los procesos químicos considerados comprenden las principales reacciones ácido base, asumiendo condiciones de equilibrio químico local e instantáneo y los procesos de precipitación. Los procesos

biológicos considerados son: eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

Los procesos incluidos en el modelo para la eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo se basan en los considerados por el modelo de fangos activados ASM2d con algunas modificaciones:

- 1_ Las bacterias acidogénicas son responsables de degradar la materia orgánica fácilmente biodegradable en condiciones anaerobias produciendo AGV. El modelo ASM2d asume que son las mismas bacterias heterótrofas las responsables de la fermentación de la materia orgánica en condiciones anaerobias, considerando que este proceso no está ligado al crecimiento bacteriano. Con la aproximación realizada en el modelo ASM2d, la velocidad del proceso de fermentación depende en gran medida de la concentración de bacterias heterótrofas y los valores descritos en la literatura para la velocidad específica de fermentación presentan una gran variabilidad. Esta variabilidad puede evitarse separando las bacterias heterótrofas en dos grupos: bacterias anaerobias fermentativas y bacterias aerobias y facultativas.
- 2_ Se ha incluido un modelo químico capaz de calcular el pH en los procesos biológicos (Serralta y col., 2004). Este modelo químico supone la adición de dos nuevos componentes, carbono inorgánico y protón.
- 3_ Las funciones que modifican la velocidad de los procesos biológicos en función del valor de la alcalinidad se han sustituido por funciones dependientes del pH.

Las modificaciones incorporadas en el modelo propuesto por el grupo CALAGUA permiten una mejor representación del proceso de depuración del agua residual. Por esta razón, para el desarrollo de este trabajo de investigación, se empleará el modelo BNRM1 el cual se describirá en un apartado posterior.

1.6.1 Generalidades del modelo biológico

El modelo BNRM1 emplea una notación similar a la utilizada en los modelos ASM. En este apartado se realiza una breve descripción de la estequiometría, cinética y notación empleadas y de esta manera lograr un mejor entendimiento de la información que se recoge en estos modelos.

1.6.1.1 Estequiometría y cinética de los modelos

Los procesos bioquímicos quedan definidos con las relaciones estequiométricas que relacionan cuantitativamente los reactivos de la reacción química con los productos y con las ecuaciones cinéticas que expresan la velocidad de reacción. En el tratamiento biológico de aguas residuales las relaciones estequiométricas se suelen expresar en unidades másicas. Además, los coeficientes estequiométricos de la reacción se normalizan respecto a uno de los reactivos utilizados o productos formados.

Si se define r_j como la velocidad de cada una de las reacciones químicas en la que participa el componente i , su velocidad de transformación (r_i) se puede obtener mediante la siguiente expresión:

$$r_i = \sum_j \nu_{i,j} r_j \quad \text{Ec. 1}$$

$\nu_{i,j}$ es el coeficiente estequiométrico normalizado del componente i en la reacción química j . Es decir, la velocidad global de transformación de un componente i resulta de la suma de todas las velocidades de las reacciones en las que participa multiplicadas por el coeficiente estequiométrico en dichas reacciones.

1.6.1.2 Formato y notación del modelo

El modo más utilizado para representar un modelo es la notación matricial. En 1987, el grupo IAWQ optó por esta modalidad demostrando una gran

utilidad. La notación matricial permite recopilar de una forma clara y sencilla toda la información referida a los diferentes compuestos y procesos. Para explicar la notación matricial se dará un ejemplo sencillo: crecimiento de las bacterias heterótrofas en un medio aerobio utilizando sustrato soluble orgánico como fuente de energía y carbono, ver Tabla 2.

Tabla 2: Ejemplo de notación matricial ilustrada con un modelo de crecimiento heterótrofo en medio aerobio

Componentes i →	1	2	3	Velocidad específica de reacción r_j (mg DQO/l d)
Proceso j ↓	X_H	S_S	S_{O_2}	
1. Crecimiento	1	$-\frac{1}{Y_H}$	$1 - \frac{1}{Y_H}$	$\mu_H \frac{S_S}{K_S + S_S} X_H$
2. Lisis	-1	1		$b_H X_H$
Parámetros estequiométricos Coeficiente estequiométrico: Y_H	Biomasa heterótrofa (mg DQO/l)	Sustrato (mg DQO/l)	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l)	Parámetros cinéticos - Velocidad de crecimiento específica de las bacterias heterótrofas: μ_H - Constante de semi-saturación: K_S - Velocidad de lisis celular: b_H

En la Tabla 2 se recoge la siguiente información: 1) los componentes i con su simbología en la primera fila y su descripción en la última, 2) los procesos j en la primera columna: crecimiento bacteriano y lisis celular, 3) los coeficientes estequiométricos $v_{i,j}$ para cada proceso j respecto a cada componente i se detallan en el centro de la matriz, 4) la expresión de la velocidad del proceso r_j se encuentra en la última columna y 5) en la misma matriz se consignan también la nomenclatura de los componentes y definición de los parámetros cinéticos.

La notación matricial facilita el planteamiento de los balances de materia de los diferentes componentes del modelo al permitir el cálculo de la velocidad global de reacción del componente considerado (r_i). Considerando la Ec. 1 es posible determinar esta velocidad. Para ello se suman los productos de los coeficientes estequiométricos que se encuentren en la columna del componente i por la ecuación de velocidad de cada proceso j en el cual participa.

De esta manera, la velocidad neta que resulta de considerar el consumo de sustrato debido al crecimiento y la producción del mismo por lisis celular está dada por:

$$r_{Ss} = -\frac{1}{Y_H} \mu_H \frac{S_s}{K_S + S_s} X_H + b_H X_H \quad \text{Ec. 2}$$

Otra ventaja de la notación matricial es que permite comprobar las ecuaciones de conservación en las filas de la matriz. Las ecuaciones de conservación se aplican a cargas eléctricas, demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales (SST) y nutrientes para demostrar que ninguno de estos términos ni se crea ni se destruye, tan sólo se transforma. La ecuación de continuidad válida para cualquier proceso j y todos los materiales c sujetos a conservación tiene la siguiente forma:

$$\sum_i v_{j,i} i_{c,i} = 0 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde: $v_{j,i}$ es el coeficiente estequiométrico del componente i en el proceso j y $i_{c,i}$ es el factor de conversión que permite el paso de las unidades del componente i a las del material c al que se aplica la ecuación de conservación.

1.6.1.3 Expresiones cinéticas de los procesos biológicos

Las expresiones de los procesos biológicos considerados siguen una cinética de Monod, es decir una velocidad máxima corregida por distintas funciones “switch” del tipo:

$$\frac{S_i}{K_{S,i} + S_i} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde S_i es el sustrato limitante y $K_{S,i}$ es la constante de semisaturación del componente i . Esta constante corresponde a la concentración de S_i para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la máxima. Las funciones

“switch” que aparecen en la expresión cinética de cada proceso corresponden a todas aquellas especies que participan en dicho proceso. La escasez de cualquiera de estas especies provoca la reducción en la velocidad del proceso.

La inhibición, que experimentan algunos procesos por determinados compuestos, se incluye en las expresiones cinéticas mediante funciones “switch” del tipo:

$$\frac{K_{I,i}}{K_{I,i} + S_i} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde $K_{I,i}$ es la constante de inhibición del componente i . Las velocidades de los diferentes procesos biológicos también dependen de la temperatura. Esta influencia se evalúa por medio de una función que modifica aquellos parámetros dependientes de la temperatura. Los valores de los parámetros considerados en el modelo se corresponden con una temperatura de 20°C. Cuando la temperatura de trabajo es distinta, el valor de los parámetros se calculará de la siguiente manera:

$$\theta_T = \theta_{20} K^{(T-20)} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde θ_T es el valor del parámetro a la temperatura T , θ_{20} es el valor a 20°C, y K es la constante de temperatura para el tipo de bacteria en cuestión.

Las generalidades descritas en las secciones anteriores se aplican a los modelos empleados para representar los procesos involucrados en la depuración del agua residual. En este trabajo de investigación el interés se centra en el modelo BNRM1, por lo cual a continuación se describirá con un cierto grado de detalle.

1.6.2 Modelo BNRM1

El modelo considera un total de 27 componentes, 13 solubles y 14 particulados, los cuales se definen a continuación.

1.6.2.1 Componentes Solubles:

S_A (M_{DQO}L⁻³): Productos de la fermentación, se considera que solamente es acetato. Debido a que la fermentación se ha incluido como un proceso biológico, los productos de la fermentación se deben modelar separadamente de los otros componentes orgánicos solubles. Aunque se considera que es acetato, en la realidad es posible encontrar diferentes productos de la fermentación.

S_{CH₄} (M_{DQO}L⁻³): Metano. Es el principal producto generado en los sistemas de digestión anaerobia.

S_F (M_{DQO}L⁻³): Sustratos orgánicos fácilmente biodegradables, fermentables. Es la fracción de la DQO soluble que está disponible directamente para la degradación por los organismos heterótrofos. Se asume que S_F puede servir como sustrato para el proceso de fermentación.

S_{H₂} (M_{DQO}L⁻³): Hidrógeno. Subproducto generado en los sistemas de digestión anaerobia, se forma en el proceso de fermentación pero en su mayoría es transformado en metano y dióxido de carbono.

S_I (M_{DQO}L⁻³): materia orgánica inerte. La principal característica de este elemento es que no puede ser degradado. Se asume que este elemento es parte del influente.

S_{IC} (M_{olC}L⁻³): Carbono inorgánico. Es la suma analítica de las concentraciones de carbonato (CO₃²⁻), bicarbonato (HCO₃⁻) y ácido carbónico (H₂CO₃). El ácido carbónico está en equilibrio con el dióxido de carbono (CO₂) disuelto, siendo la concentración de este último del orden de 100 veces superior a la de ácido carbónico. Por este motivo la concentración de CO₂ también se incluye en este componente.

S_{N₂} (M_NL⁻³): nitrógeno gaseoso, N₂. Se asume que solamente es un producto de la desnitrificación.

S_{NH₄} (M_NL⁻³): amonio más nitrógeno amoniacal. Para el balance de las cargas eléctricas, se asume que el S_{NH₄} es solamente NH₄⁺, sin embargo, en la realidad esta compuesto de NH₃+ NH₄⁺.

S_{NO₃} (M_NL⁻³): nitrato más nitrito (NO₃⁻ + NO₂⁻). Se asume que está

compuesto por nitrato y nitrito, debido a que el nitrito no está incluido como un componente del modelo.

S_{O2} (M_{O2}L⁻³): oxígeno disuelto.

S_{PO4}(M_PL⁻³): fósforo soluble inorgánico, principalmente ortofosfatos. Para el balance de las cargas eléctricas, se asume que este componente está compuesto de un 50% de H₂PO₄⁻ y un 50% de HPO₄²⁻, independiente del pH.

S_{PRO} (M_{DQO}L⁻³): Productos de la fermentación excluyendo el ácido acético. Se incluyen en este componente los ácidos grasos volátiles que se generan en el proceso de fermentación y que no pueden ser transformados directamente en metano (propiónico, butírico, valérico...). Para los cálculos estequiométricos se asume que S_{PRO} equivale a propionato.

S_{TH} (M_{olH}L⁻³): Protón. Este componente representa la concentración total de protones en disolución, siendo la suma analítica de las concentraciones de protones libres en disolución (H⁺), y protones combinados formando parte de otras especies (HCO₃⁻, H₂CO₃, HPO₄²⁻, H₂PO₄⁻....)

1.6.2.2 Componentes particulados:

X_{ACET} (M_{DQO}L⁻³): bacterias acetogénicas. Son los organismos responsables de la transformación de los ácidos grasos volátiles que no pueden ser transformados en metano en ácido acético.

X_{ACID} (M_{DQO}L⁻³): bacterias acidogénicas. Son los organismos responsables de la generación de ácidos grasos volátiles por fermentación y de la hidrólisis de la materia orgánica particulada en condiciones anaerobias.

X_{AUT} (M_{DQO}L⁻³): organismos nitrificantes autótrofos. Son los responsables de la nitrificación. Se asume que estos organismos incluyen tanto las bacterias amonioxidantes como las nitritoxidantes.

X_H (M_{DQO}L⁻³): organismos heterótrofos. Se asume que estos organismos pueden crecer en condiciones aerobias y anóxicas. Son los responsables de los procesos de hidrólisis de los sustratos particulados y pueden usar todos los sustratos solubles orgánicos degradables (S_A y S_F).

X_I (M_{DQO}L⁻³): material orgánico inerte. Este material no se puede degradar.

X_I puede ser una fracción del influente o puede producirse dentro del proceso de lisis (muerte celular).

X_{MAC} ($M_{DQO}L^{-3}$): bacterias metanogénicas acetoclásticas. Estos organismos son anaerobios estrictos y son los responsables de la conversión del ácido acético en metano.

X_{MH_2} ($M_{DQO}L^{-3}$): bacterias metanogénicas hidrogenotróficas. Estos organismos son anaerobios estrictos y son los responsables de la conversión del hidrógeno en metano.

X_{NV} ($M_{SST}L^{-3}$): Sólidos suspendidos no volátiles. Este componente no participa en los procesos biológicos, únicamente se concentra por sedimentación.

X_{PAO} ($M_{DQO}L^{-3}$): organismos acumuladores de polifosfatos (PAOs). Se asume que estos organismos representan a todos los organismos acumuladores de polifosfatos. La concentración de X_{PAO} no incluye los productos que se almacenan intracelularmente (X_{PP} y X_{PHA}).

X_{PHA} ($M_{DQO}L^{-3}$): es un producto almacenado intracelularmente en las bacterias PAO. Éste incluye polihidroxicanoatos (PHA), glucógeno, etc. Se suele asociar con X_{PAO} , sin embargo, no está incluido en la masa de estas bacterias. Se asume que tiene la composición química de polihidroxibutirato, $(C_4H_6O_2)_n$.

X_{PP} ($M_{P}L^{-3}$): polifosfato. El polifosfato es un producto almacenado intracelularmente en las PAO. Se presenta solamente asociado con X_{PAO} , sin embargo, no está incluido en la masa de X_{PAO} . Forma parte del fósforo particulado. Se asume que tiene la composición química $(K_{0.33}Mg_{0.33}PO_3)_n$.

X_S ($M_{DQO}L^{-3}$): sustrato lentamente biodegradable. Es un sustrato orgánico particulado y coloidal de alto peso molecular que necesita ser hidrolizado antes de estar disponible para la degradación. Se asume que los productos de la hidrólisis (S_F) se pueden fermentar.

X_{MEOH} ($M_{SST}L^{-3}$): hidróxidos metálicos. Este componente se añade al sistema para llevar a cabo el proceso de precipitación química del fósforo. Se asume que este componente está compuesto de $Fe(OH)_3$. Es posible reemplazar este componente por otros reactivos.

X_{MEP} ($M_{SST}L^{-3}$): fosfatos metálicos. Este componente resulta de la precipitación química del fósforo. Se asume que está compuesto de $FePO_4$.

X_{TSS} ($M_{SST}L^{-3}$): sólidos suspendidos totales, SST. No son un componente del modelo pero se calcula su concentración a partir de los correspondientes factores estequiométricos.

1.6.2.3 Ecuaciones de continuidad

La estequiometría del modelo BNRM1 se basa en 6 ecuaciones de continuidad aplicadas a la DQO, nitrógeno, fósforo, sólidos suspendidos totales, carbono y protones. Estas ecuaciones se utilizan para calcular los coeficientes estequiométricos de S_{O_2} (S_{NO_3} y S_{N_2} en la desnitrificación) a partir de la DQO, S_{NH_4} a partir del nitrógeno, S_{PO_4} a partir del fósforo, X_{TSS} a partir de los sólidos suspendidos totales, S_{IC} a partir del carbono, y S_H a partir de los protones. Los factores de conversión necesarios para aplicar las ecuaciones de continuidad se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Factores de conversión para la aplicación de las ecuaciones de continuidad.

Ecuación continuidad→	DQO	N	P	SST	C	H ⁺
Factor →	$i_{COD,i}$	$i_{N,i}$	$i_{P,i}$	$i_{TSS,i}$	$i_{C,i}$	$i_{H,i}$
Componente ↓	g COD	g N	g P	g TSS	mol C	mol H
S_{O_2} (g O ₂)	-1					
S_F (g COD)	1	i_{NSF}	i_{PSF}		i_{CSF}	
S_A (g COD)	1				2/64	1/64
S_{PRO} (g COD)	1				3/112	1/112
S_{NH_4} (g N)		1				-1/14
S_{NO_3} (g N)		1				1/14
S_{PO_4} (g P)			1			3/31
S_I (g COD)	1	i_{NSI}	i_{PSI}		i_{CSI}	
S_{N_2} (g N)		1				
S_{H_2} (g COD)	1					
S_{CH_4} (g COD)	1				1/64	
S_{IC} (mol C)					1	2
S_{TH} (mol H ⁺)						1
X_I (g COD)	1	i_{NXI}	i_{PXI}	i_{TSSXI}	i_{CXI}	
X_S (g COD)	1	i_{NXS}	i_{PXS}	i_{TSSXS}	i_{CXS}	
X_{BM} (g COD)	1	0.07	0.02	0.7	5/160	
X_{PHA} (g COD)	1			0.6	1/36	
X_{PP} (g P)			1	3.23		1/31
X_{TSS} (g TSS)				-1		
X_{MeOH} (g TSS)				1		
X_{MeP} (g TSS)			0.205	1		

1.6.2.4 Procesos cinéticos

El modelo BNRM1 considera 30 procesos biológicos y 6 procesos físicos controlados por la cinética. Estos están descritos por diferentes ecuaciones en las cuales intervienen un número importante de parámetros cinéticos los cuales se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros del modelo BNRM1.

PARÁMETRO	UNIDAD	VALOR A 20°C	Definición
HIDRÓLISIS			
K_H	d^{-1}	3.0	Velocidad de hidrólisis.
η_{NO_3}	-	0.60	Factor de eficacia de la hidrólisis en condiciones anóxicas
η_{fe}	-	0.1	Factor de eficacia de la hidrólisis en condiciones anaerobias
K_{O_2}	$g\ O_2\ m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{O_2}
K_{NO_3}	$g\ O_2\ m^{-3}$	0.5	Constante de semisaturación de S_{NO_3}
K_X	$g\ DQO/ g\ DQO$	0.1	Constante de semisaturación de la materia orgánica
BACTERIAS HETRÓTROFAS			
μ_H	d^{-1}	6.0	Velocidad de crecimiento de heterótrofas
η_H	-	0.8	Factor de eficacia en condiciones anóxicas
b_H	d^{-1}	0.4	Velocidad de lisis celular
K_{O_2}	$g\ O_2\ m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{O_2}
K_F	$g\ DQO\ m^{-3}$	4.0	Constante de semisaturación para S_F
K_A	$g\ DQO\ m^{-3}$	4.0	Constante de semisaturación para S_A
K_{PRO}	$g\ DQO\ m^{-3}$	4.0	Constante de semisaturación para S_{PRO}
K_{NO_3}	$g\ N\ m^{-3}$	0.5	Constante de semisaturación de S_{NO_3}
K_{NH_4}	$g\ N\ m^{-3}$	0.05	Constante de semisaturación de S_{NH_4}
K_P	$g\ P\ m^{-3}$	0.01	Constante de semisaturación de S_{PO_4}
K_H	$mol\ H^+\ m^{-3}$	$2\ 10^{-7}$	Constante de semisaturación de S_H en la función de pH
$K_{I,H}$	$mol\ H^+\ m^{-3}$	$4.35\ 10^{-3}$	Constante de inhibición de S_H en la función de pH
BACTERIAS PAO			
q_{PHA}	$g\ DQO/g\ PAO\ d$	3.0	Velocidad de toma de S_A
q_{PP}	$g\ DQO/g\ PAO\ d$	1.5	Velocidad de almacenamiento de X_{PP}
μ_{PAO}	d^{-1}	1.0	Velocidad de crecimiento de X_{PAO}
η_{PAO}	-	0.6	Factor de eficacia del crecimiento de X_{PAO} en condiciones anóxicas
η_{PP}	-	0.6	Factor de eficacia del almacenamiento de X_{PP} en condiciones anóxicas
b_{PAO}	d^{-1}	0.2	Velocidad de lisis de X_{PAO}
b_{PP}	d^{-1}	0.2	Velocidad de lisis de X_{PP}
b_{PHA}	d^{-1}	0.2	Velocidad de lisis de X_{PHA}
K_{O_2}	$g\ O_2\ m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{O_2}
K_A	$g\ DQO\ m^{-3}$	4.0	Constante de semisaturación de S_A
K_{PRO}	$g\ DQO\ m^{-3}$	4.0	Constante de semisaturación para S_{PRO}
K_{NH_4}	$g\ N\ m^{-3}$	0.05	Constante de semisaturación de S_{NH_4}
K_{PS}	$g\ P\ m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{PO_4} del almacenamiento de X_{PP}
K_P	$g\ P\ m^{-3}$	0.01	Constante de semisaturación de S_{PO_4}
K_{TOTC}	$mol\ C\ m^{-3}$	$5\ 10^{-4}$	Constante de semisaturación de S_{IC}
K_{PP}	$g\ PP/ g\ PAO$	0.01	Constante de semisaturación de X_{PP}
K_{MAX}	$g\ PP/ g\ PAO$	0.34	Cociente máximo de X_{PP}/X_{PAO}
K_{IPP}	$g\ PP/ g\ PAO$	0.02	Coefficiente de inhibición para almacenamiento de X_{PP}
K_{PHA}	$g\ PHA/ g\ PAO$	0.01	Constante de semisaturación de X_{PHA}
K_H	$mol\ C\ m^{-3}$	$6\ 10^{-7}$	Constante de semisaturación de S_H en la función de pH
$K_{I,H}$	$mol\ H^+\ m^{-3}$	$4.19\ 10^{-3}$	Constante de inhibición de S_H en la función de pH

BACTERIAS AUTÓTROFAS			
μ_{AUT}	d^{-1}	1.0	Velocidad de crecimiento de X_{AUT}
b_{AUT}	d^{-1}	0.15	Velocidad de lisis de X_{AUT}
K_{O_2}	$g O_2 m^{-3}$	0.5	Constante de semisaturación de S_{O_2}
K_{NH_4}	$g N m^{-3}$	1.0	Constante de semisaturación de S_{NH_4}
K_P	$g P m^{-3}$	0.01	Constante de semisaturación de S_{PO_4}
K_{TOTC}	$mol C m^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	Constante de semisaturación de S_{IC}
K_H	$mol H^+ m^{-3}$	$2 \cdot 10^{-7}$	Constante de semisaturación de S_H en la función de pH
$K_{I,H}$	$mol H^+ m^{-3}$	$8.71 \cdot 10^{-4}$	Constante de inhibición de S_H en la función de pH
PRECIPITACIÓN			
K_{PRE}	$m^3 (g (Fe(OH)_3)^{-1} d^{-1}$	1.0	Constante de velocidad de precipitación de S_{PO_4}
K_{RED}	d^{-1}	0.6	Constante de velocidad de redisolución
K_{ALK}	$mol HCO_3^- m^{-3}$	0.5	Constante de semisaturación de alcalinidad
HIDRÓLISIS ACIDOGÉNICAS			
K_H	d^{-1}	43	Velocidad de hidrólisis
K_X	$g DQO / g DQO$	150	Constante de semisaturación de la materia orgánica
K_{O_2}	$g O_2 m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{O_2}
BACTERIAS ACIDOGÉNICAS			
μ_{ACID}	d^{-1}	2.2	Velocidad de crecimiento de X_{ACID}
b_{ACID}	d^{-1}	0.33	Velocidad de lisis de X_{ACID}
K_F	$g DQO m^{-3}$	15	Constante de semisaturación de S_F
K_{O_2}	$g O_2 m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{O_2}
K_A	$g DQO m^{-3}$	6500	Constante de inhibición de S_A
K_{H_2}	$g DQO m^{-3}$	35	Constante de inhibición de S_{H_2}
K_{NH_4}	$g N m^{-3}$	0.05	Constante de semisaturación de S_{NH_4}
K_P	$g P m^{-3}$	0.01	Constante de semisaturación de S_{PO_4}
K_H	$mol H^+ m^{-3}$	$2 \cdot 10^{-7}$	Constante de semisaturación de S_H en la función de pH
$K_{I,H}$	$mol H^+ m^{-3}$	$4.35 \cdot 10^{-3}$	Constante de inhibición de S_H en la función de pH
BACTERIAS ACETOGÉNICAS			
μ_{PRO}	d^{-1}	0.177	Velocidad de crecimiento de X_{ACET}
b_{PRO}	d^{-1}	0.028	Velocidad de lisis de X_{ACET}
K_{PRO}	$g DQO m^{-3}$	10	Constante de semisaturación de S_{PRO}
K_{O_2}	$g O_2 m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{O_2}
K_A	$g DQO m^{-3}$	1500	Constante de inhibición de S_A
K_{H_2}	$g DQO m^{-3}$	0.6	Constante de inhibición de S_{H_2}
K_{NH_4}	$g N m^{-3}$	0.05	Constante de semisaturación de S_{NH_4}
K_P	$g P m^{-3}$	0.01	Constante de semisaturación de S_{PO_4}
K_H	$mol H^+ m^{-3}$	10^{-5}	Constante de semisaturación de S_H en la función de pH
$K_{I,H}$	$mol H^+ m^{-3}$	$6.3 \cdot 10^{-4}$	Constante de inhibición de S_H en la función de pH
BACTERIAS METANOGÉNICAS ACETOTRÓFICAS			
μ_{MAC}	d^{-1}	0.106	Velocidad de crecimiento de X_{MAC}
b_{MAC}	d^{-1}	0.028	Velocidad de lisis de X_{MAC}
K_A	$g DQO m^{-3}$	30	Constante de semisaturación de S_A
K_{O_2}	$g O_2 m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{O_2}
K_H	$mol H^+ m^{-3}$	10^{-5}	Constante de semisaturación de S_H en la función de pH
$K_{I,H}$	$mol H^+ m^{-3}$	$6.3 \cdot 10^{-4}$	Constante de inhibición de S_H en la función de pH
K_{NH_4}	$g N m^{-3}$	0.05	Constante de semisaturación de S_{NH_4}
K_P	$g P m^{-3}$	0.01	Constante de semisaturación de S_{PO_4}
BACTERIAS METANOGÉNICAS HIDROGENOTRÓFICAS			
μ_{MH_2}	d^{-1}	0.551	Velocidad de crecimiento de X_{MH_2}
b_{MH_2}	d^{-1}	0.112	Velocidad de lisis de X_{MH_2}
K_{H_2}	$g DQO m^{-3}$	0.6	Constante de semisaturación de S_{H_2}
K_{O_2}	$g O_2 m^{-3}$	0.2	Constante de semisaturación de S_{O_2}
K_H	$mol H^+ m^{-3}$	10^{-5}	Constante de semisaturación de S_H en la función de pH
$K_{I,H}$	$mol H^+ m^{-3}$	$6.3 \cdot 10^{-4}$	Constante de inhibición de S_H en la función de pH
K_{NH_4}	$g N m^{-3}$	0.05	Constante de semisaturación de S_{NH_4}
K_P	$g P m^{-3}$	0.01	Constante de semisaturación de S_{PO_4}
K_{TOTC}	$mol C m^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	Constante de semisaturación de S_{IC}

En la Tabla 5 se detallan los coeficientes estequiométricos del modelo y valores propuestos de los mismos.

Tabla 5: Coeficientes estequiométricas del modelo BNRM1

PARÁMETRO	UNIDAD	VALOR A 20°C	DEFINICIÓN
HIDRÓLISIS			
f_{SI}	g DQO/ g DQO	0.0	Fracción de DQO inerte en el sustrato particulado
BACTERIAS HETERÓTROFAS			
Y_H	g DQO/ g DQO	0.63	Rendimiento de X_H
f_{XI}	g DQO/ g DQO	0.10	Fracción de DQO inerte generado en la lisis celular
BACTERIAS PAO			
Y_{PAO}	g DQO/ g DQO	0.63	Rendimiento de bacterias X_{PAO}
Y_{PO4}	g P/ g DQO	0.40	X_{PP} hidrolizado para almacenar X_{PHA}
Y_{PHA}	g DQO/ g DQO	0.20	X_{PHA} hidrolizado para almacenar X_{PP}
f_{XI}	g DQO/ g DQO	0.10	Fracción de DQO inerte generado en la lisis celular
BACTERIAS AUTÓTROFAS			
Y_{AUT}	g DQO/ g N	0.24	Rendimiento de bacterias X_{AUT}
f_{XI}	g DQO/ g DQO	0.10	Fracción de DQO inerte generado en la lisis celular
HIDRÓLISIS ACIDOGÉNICAS			
f_{XI}	g DQO/ g DQO	0.05	Fracción de DQO inerte generado en la hidrólisis
BACTERIAS ACIDOGÉNICAS			
Y_{ACID}	g DQO/ g DQO	0.15	Rendimiento de bacterias X_{ACID}
f_{XI}	g DQO/ g DQO	0.20	Fracción de DQO inerte generado en la lisis celular
f_{AC}	g DQO/ g DQO	0.58	S_A producido/ S_F consumido
f_{PRO}	g DQO/ g DQO	0.25	S_{PRO} producido/ S_F consumido
f_{H2}	g DQO/ g DQO	0.17	S_{H2} producido/ S_F consumido
BACTERIAS ACETOGÉNICAS			
Y_{PRO}	g DQO/ g DQO	0.05	Rendimiento de bacterias X_{ACET}
f_{XI}	g DQO/ g DQO	0.20	Fracción de DQO inerte generado en la lisis celular
f_{AC}	g DQO/ g DQO	0.568	S_A producido/ S_{PRO} consumido
f_{H2}	g DQO/ g DQO	0.432	S_{H2} producido/ S_{PRO} consumido
BACTERIAS METANOGÉNICAS ACETOTRÓFICAS			
Y_{MAC}	g DQO/ g DQO	0.025	Rendimiento de bacterias X_{MAC}
f_{XI}	g DQO/ g DQO	0.20	Fracción de DQO inerte generado en la lisis celular
BACTERIAS METANOGÉNICAS HIDROGENOTRÓFICAS			
Y_{MH2}	g DQO/ g DQO	0.045	Rendimiento de bacterias X_{MH2}
f_{XI}	g DQO/ g DQO	0.20	Fracción de DQO inerte generado en la lisis celular

A continuación se realiza una descripción de los diversos procesos agrupados en función de las bacterias que los realizan.

1.6.2.4.1 Bacterias Heterótrofas

Estas bacterias son responsables de numerosos procesos, los cuales se mencionan a continuación:

Hidrólisis:

La hidrólisis consiste en la transformación de la materia orgánica lentamente biodegradable en materia orgánica fácilmente biodegradable mediante reacciones enzimáticas externas que rompen los productos

orgánicos en fracciones más pequeñas. Los productos de la hidrólisis pasan directamente a la disolución para posteriormente ser degradados por los microorganismos. Tradicionalmente, las reacciones de hidrólisis se han considerado reacciones de superficie que ocurren por contacto entre los microorganismos que proveen las enzimas hidrolíticas y el sustrato orgánico sujeto a la hidrólisis.

Las reacciones de hidrólisis dependen del aceptor de electrones disponible. Por esta razón, se distinguen tres procesos de hidrólisis: 1) Hidrólisis aerobia ($S_{O_2} > 0$), 2) Hidrólisis anóxica ($S_{O_2} \approx 0$; $S_{NO_3} > 0$) y 3) Hidrólisis anaerobia ($S_{O_2} \approx 0$; $S_{NO_3} \approx 0$).

El modelo BNRM1, de igual manera que el ASM2d, asume que el sustrato lentamente biodegradable X_S es degradado a sustrato fácilmente biodegradable S_F y se genera una pequeña fracción f_{SI} de materia orgánica inerte S_I .

Crecimiento:

Los microorganismos heterótrofos X_H hidrolizan el sustrato lentamente biodegradable X_S , el cual se transforma en materia orgánica rápidamente biodegradable S_F . El modelo BNRM1, a diferencia del modelo ASM2d, no sólo considera que las bacterias heterótrofas consumen en condiciones aerobias y anóxicas S_F y S_A sino que además consumen S_{PRO} . Estos procesos se explican brevemente a continuación y se representan en la Tabla 6.

4, 5 y 6) Crecimiento aerobio de X_H a partir de S_F , S_A y S_{PRO} . Se considera que estos procesos están caracterizados por la misma velocidad específica de crecimiento y el mismo coeficiente de rendimiento Y_H .

7, 8 y 9) Crecimiento anóxico de X_H a partir de sustrato S_F , S_A y S_{PRO} . Estos procesos son similares a los anteriores, sin embargo emplean nitrato como aceptor de electrones.

10) Lisis de los microorganismos heterótrofos.

En la Tabla 6 se muestra la matriz que describe los procesos de las bacterias heterótrofas.

Tabla 6: Estequiometría de los procesos de las bacterias heterótrofas.

	Componente $i \rightarrow$	S_{O_2}	S_F	S_A	S_{PRO}	S_I	S_{NO_3}	S_{N_2}	X_I	X_S	X_H
j	Proceso										
1	Hidrólisis aerobia		$1 - f_{SI}$			f_{SI}				-1	
2	Hidrólisis anóxica		$1 - f_{SI}$			f_{SI}				-1	
3	Hidrólisis anaerobia		$1 - f_{SI}$			f_{SI}				-1	
4	Crec. aerobio a partir de S_F	$1 - \frac{1}{Y_H}$	$-\frac{1}{Y_H}$								1
5	Crec. aerobio a partir de S_A	$1 - \frac{1}{Y_H}$		$-\frac{1}{Y_H}$							1
6	Crec. aerobio a partir de S_{PRO}	$1 - \frac{1}{Y_H}$			$\frac{1}{Y_H}$						1
7	Crec. anóxico a partir de S_F		$-\frac{1}{Y_H}$				$-\frac{1 - Y_H}{2.86 Y_H}$	$\frac{1 - Y_H}{2.86 Y_H}$			1
8	Crec. anóxico a partir de S_A			$-\frac{1}{Y_H}$			$-\frac{1 - Y_H}{2.86 Y_H}$	$\frac{1 - Y_H}{2.86 Y_H}$			1
9	Crec. anóxico a partir de S_{PRO}				$\frac{1}{Y_H}$		$-\frac{1 - Y_H}{2.86 Y_H}$	$\frac{1 - Y_H}{2.86 Y_H}$			1
10	Lisis								f_{XI}	$1 - f_{XI}$	-1

1.6.2.4.2 Bacterias PAO.

Estas bacterias almacenan AGV en condiciones anaerobias en forma de X_{PHA} . La energía necesaria la obtienen de la degradación de las reservas de polifosfato a fosfato que vierten al medio. El X_{PHA} almacenado es oxidado en condiciones anóxicas y aerobias y la energía obtenida es utilizada por las bacterias para crecer y tomar fósforo reponiendo las reservas de polifosfato.

El modelo BNRM1 a diferencia del modelo ASM2d considera que las bacterias PAO consumen también el producto de fermentación S_{PRO} . Sin embargo, no están incluidos en el modelo todos los fenómenos observados experimentalmente. Así, el glucógeno, que es un producto almacenado intracelularmente por estos organismos de gran importancia en su metabolismo, no está incluido. A continuación se detallan brevemente los procesos considerados.

11 y 12) Almacenamiento de X_{PHA} a partir de S_A y S_{PRO} . El modelo considera que las PAO pueden liberar el fosfato (S_{PO_4}) procedente de las reservas de polifosfatos (X_{PP}) y utilizar la energía producida para almacenar intracelularmente los productos de la fermentación, S_A y S_{PRO} . Este proceso se observó inicialmente bajo condiciones anaerobias. Sin embargo, como también se ha detectado bajo condiciones anóxicas y aerobias la expresión cinética correspondiente no incluye funciones de inhibición para S_{O_2} y S_{NO_3} .

13 y 14) Almacenamiento aerobio de polifosfatos y crecimiento aerobio. En estos procesos las bacterias PAO almacenan fósforo soluble en forma de X_{PP} . Las bacterias PAO obtienen la energía necesaria para este proceso de la oxidación del X_{PHA} acumulado. La regeneración de las reservas de polifosfato es fundamental para el crecimiento de las bacterias PAO porque los ácidos volátiles sólo pueden ser almacenados utilizando la energía obtenida de la degradación de los polifosfatos.

15 y 16) Almacenamiento anóxico de polifosfatos y crecimiento anóxico. La velocidad de almacenamiento de polifosfatos, q_{PP} , en condiciones anóxicas viene dada por la velocidad de almacenamiento de polifosfatos en condiciones aerobias reducida por el factor η_{NO_3} . Este factor tiene en cuenta el hecho de que no todas las bacterias PAO son desnitrificantes y que el proceso se lleva a cabo a una velocidad inferior. La velocidad de crecimiento de las bacterias PAO, μ_{PAO} , en condiciones anóxicas se aproxima como la velocidad de crecimiento en condiciones aerobias reducida por el factor de eficacia η_{NO_3} .

17, 18 y 19) Lisis de X_{PAO} , X_{PP} y X_{PHA} , respectivamente. Representan los procesos de lisis de las bacterias PAO y sus productos de almacenamiento. La muerte, respiración endógena y mantenimiento celular provocan la pérdida o deterioro de estos componentes. Debido a que los productos de almacenamiento X_{PP} y X_{PHA} se consideran independientes de la biomasa X_{PAO} , los tres componentes están sujetos a procesos de lisis por separado. El modelo BNRM1 incluye 3 procesos de lisis de primer orden respecto al

componente que desaparece. Si las constantes de velocidad de los tres procesos son iguales, la composición de los microorganismos no cambia en los procesos de desaparición. Sin embargo, existen evidencias experimentales demostrando que X_{PP} se descompone más rápido que X_{PHA} y X_{PAO} . Esta pérdida adicional de polifosfatos puede modelarse matemáticamente aumentando el valor de la constante de velocidad, b_{PP} , para la lisis de este componente. Los productos de la lisis de los microorganismos PAO se han definido por analogía a los de los organismos heterótrofos. Las reservas orgánicas y los polifosfatos se supone que se descomponen dando S_A y S_{PO_4} , respectivamente.

La Tabla 7 muestra la estequiometría de los procesos biológicos de las bacterias PAO. En esta tabla se han considerado los parámetros: $Y_{PHA,NO}$ (gDQO/gP) y $Y_{PAO,NO}$ (gDQO/gDQO) los cuales representan la cantidad de X_{PHA} necesaria para acumular 1 g de fósforo y el rendimiento de las bacterias PAO en condiciones anóxicas, respectivamente.

Tabla 7: Estequiometría de los procesos de las bacterias PAO.

	Componente $i \rightarrow$	S_{O_2}	S_A	S_{PRO}	S_{NO_3}	S_{PO_4}	S_{N_2}	X_I	X_S	X_{PAO}	X_{PP}	X_{PHA}
j	Proceso											
11	Alm.* de X_{PHA} a partir de S_A		-1			Y_{PO_4}					$-Y_{PO_4}$	1
12	Alm.* de X_{PHA} a partir de S_{PRO}			-1		Y_{PO_4}					$-Y_{PO_4}$	1
13	Alm.* aerobio de X_{PP}	$-Y_{PHA}$				-1					1	$-Y_{PHA}$
14	Crecimiento aerobio	$1 - \frac{1}{Y_{PAO}}$				$-i_{PBM}$				1		$-\frac{1}{Y_{PAO}}$
15	Alm.* anóxico de X_{PP}				$-\frac{Y_{PHA,NO}}{2.86}$	-1	$\frac{Y_{PHA,NO}}{2.86}$				1	$-Y_{PHA,NO}$
16	Crecimiento anóxico				$1 - \frac{1}{Y_{PAO,NO}}$	$-i_{PBM}$	$1 - \frac{1}{Y_{PAO,NO}}$			1		$-\frac{1}{Y_{PAO,NO}}$
17	Lisis de X_{PAO}							f_{XI}	$1 - f_{XI}$	-1		
18	Lisis de X_{PP}					1					-1	
19	Lisis de X_{PHA}		1									-1

*Alm.: Almacenamiento.

1.6.2.4.3 Bacterias autótrofas

El modelo considera la nitrificación como un proceso de una sola etapa, donde el amonio S_{NH_4} se transforma directamente a nitrato S_{NO_3} . Los componentes intermedios, nitritos, no se incluyen como un componente del modelo para no incrementar su complejidad.

20) Crecimiento de los microorganismos autótrofos. Las bacterias autótrofas son microorganismos aerobios obligados, consumen amonio como sustrato y nutriente, y producen nitratos. El proceso de nitrificación consume alcalinidad.

21) Lisis de los microorganismos nitrificantes. La lisis de las bacterias nitrificantes produce X_S y por hidrólisis de ese compuesto se obtiene S_F , sustratos que utilizan los microorganismos heterótrofos.

En la Tabla 8 se incluyen los procesos de las bacterias autótrofas.

Tabla 8: Estequiometría de los procesos de las bacterias autótrofas.

	Componente $i \rightarrow$	S_{O_2}	S_{NH_4}	S_{NO_3}	X_I	X_S	X_{AUT}
j	Proceso						
20	Nitrificación	$1 - \frac{4.57}{Y_A}$	$-\frac{1}{Y_A} - i_{NBM}$	$\frac{1}{Y_A}$			1
21	Lisis				f_{XI}	$1 - f_{XI}$	-1

1.6.2.4.4 Bacterias acidogénicas

Estas bacterias son responsables del proceso de fermentación. Mediante este proceso la materia orgánica fermentable es transformada bajo condiciones anaerobias en ácidos grasos volátiles. Estas bacterias también son capaces de hidrolizar la materia orgánica suspendida en condiciones anaerobias. La Tabla 9 muestra la estequiometría de los procesos mencionados.

Tabla 9: Estequiometría de los procesos de las bacterias acidogénicas

	Componente $i \rightarrow$	S_F	S_A	S_I	X_I	X_S	S_{PRO}	S_{H_2}	X_{ACID}
j	Proceso								
22	Hidrólisis	$1-f_{SI}$		f_{SI}		-1			
23	Fermentación	$-\frac{1}{Y_{ACID}}$	$\left(\frac{1}{Y_{ACID}} - 1\right)f_{AC}$				$\left(\frac{1}{Y_{ACID}} - 1\right)f_{PRO}$	$\left(\frac{1}{Y_{ACID}} - 1\right)f_{H_2}$	1
24	Lisis				f_{XI}	$1-f_{XI}$			-1

1.6.2.4.5 Bacterias Acetogénicas

Estas bacterias son responsables de la transformación de los ácidos grasos volátiles en ácido acético e hidrógeno, que son los precursores del metano. La tabla siguiente muestra la estequiometría de los procesos llevados a cabo por estas bacterias.

Tabla 10: Estequiometría de los procesos de las bacterias acetogénicas.

	Componente $i \rightarrow$	S_A	X_I	X_S	S_{PRO}	S_{H_2}	X_{PRO}
j	Proceso						
25	Conversión de S_{PRO} en S_A	$\left(\frac{1}{Y_{PRO}} - 1\right)f_{AC}$			$-\frac{1}{Y_{PRO}}$	$\left(\frac{1}{Y_{PRO}} - 1\right)f_{H_2}$	1
26	Lisis		f_{XI}	$1-f_{XI}$			-1

1.6.2.4.6 Bacterias Metanogénicas

El modelo BNRM1 considera dos grupos de bacterias metanogénicas: acetoclásticas (responsables de la transformación del ácido acético en metano) e hidrogenotróficas (responsables de la transformación del hidrógeno en metano). La Tabla 11 muestra la estequiometría de los procesos llevados a cabo por estas bacterias.

Tabla 11: Estequiometría de los procesos de las bacterias metanogénicas.

	Componente $i \rightarrow$	S_A	X_I	X_S	S_{H_2}	S_{CH_4}	X_{MAC}	X_{MH_2}
j	Proceso							
27	Conversión de S_A en metano	$-\frac{1}{Y_{MAC}}$				$\frac{1}{Y_{MAC}} - 1$	1	
28	Lisis de X_{MAC}		f_{XI}	$1-f_{XI}$			-1	
29	Conversión de S_{H_2} en metano				$-\frac{1}{Y_{MH_2}}$	$\frac{1}{Y_{MH_2}} - 1$		1
30	Lisis de X_{MH_2}		f_{XI}	$1-f_{XI}$				-1

1.6.2.4.7 Procesos físico-químicos

El modelo BNRM1 considera el proceso de precipitación química del fósforo de forma análoga al ASM2d. Además se incluyen los procesos de desabsorción de los distintos gases considerados en el modelo (oxígeno, hidrógeno, metano, dióxido de carbono y nitrógeno). La Tabla 12 muestra la estequiometría de estos procesos.

Tabla 12: Estequiometría de los procesos físico-químicos.

	Componente $i \rightarrow$	S_{PO_4}	X_{MEOH}	X_{MEP}	S_{O_2}	S_{H_2}	S_{CH_4}	S_{IC}	S_H	S_{N_2}
j	Proceso									
31	Precipitación	-1	-3.45	4.87						
32	Redisolución	1	3.45	-4.87						
33	Desabsorción de O_2				-1					
34	Desabsorción de H_2					-1				
35	Desabsorción de CH_4						-1			
36	Desabsorción de CO_2							-1	-2	
37	Desabsorción de N_2									-1

En todos los procesos considerados en el modelo, los coeficientes estequiométricos del amonio, fosfato, sólidos suspendidos, carbono inorgánico y protones se calculan a partir de las ecuaciones de continuidad.

Las expresiones cinéticas utilizadas para representar la velocidad de los procesos antes comentados se muestran en la Tabla 14. En esta tabla se han utilizado las abreviaturas M_{O_2} , M_{NO_3} , M_{NH_4} y M_{PO_4} para las funciones “switch” de semisaturación correspondientes al oxígeno, nitrato, amonio y fosfato, respectivamente. Cada una de estas funciones representa la Ec. 4.

Las funciones “switch” de inhibición correspondiente al oxígeno y al nitrato se han nombrado mediante las abreviaturas I_{O_2} y I_{NO_3} , respectivamente. Estas funciones representan el término de inhibición no competitiva descrito por la Ec. 5.

La inhibición de la velocidad de los distintos procesos biológicos por el valor de pH del medio se ha denominado I_{pH} y representa la combinación de la función “switch” de semisaturación y la inhibición no competitiva tal y como muestra la siguiente expresión:

$$I_{pH} = \frac{S_H}{K_{pH} + S_H} \cdot \frac{K_{I,pH}}{K_{I,pH} + S_H} \cdot \frac{1}{f_{pH}} \quad \text{Ec. 7}$$

Donde: S_H representa la concentración de protones libres en disolución, K_{pH} y $K_{I,pH}$ las constantes de semisaturación e inhibición respectivamente y f_{pH} es un factor que representa el valor máximo del producto de ambas funciones “switch”. Este factor se utiliza para eliminar la inhibición por el pH ($I_{pH}=1$) en las condiciones de pH óptimo. Derivando esta expresión con respecto a la concentración de protones se obtiene que el máximo de la función se produce cuando la concentración de protones es igual a:

$$S_H = \sqrt{K_{pH} \cdot K_{I,pH}} \quad \text{Ec. 8}$$

La Tabla 13 muestra los valores recomendados para los distintos factores de conversión del modelo.

Tabla 13: Valores recomendados de los factores de conversión del modelo BNRM1.

Fósforo		Nitrógeno		Carbono	
i_{PSF}	0.03	i_{NSF}	0.01	i_{CSF}	0.025
i_{PSI}	0.01	i_{NSI}	0	i_{CSI}	0.03
i_{PXS}	0.04	i_{NXS}	0.01	i_{CXS}	0.025
i_{PXI}	0.03	i_{NXI}	0.01	i_{CXI}	0.03

En la Tabla 14 se exponen las expresiones cinéticas de todos los procesos considerados en el modelo BNRM1.

Tabla 14: Expresiones cinéticas de los procesos del modelo BNRM1.

j	Proceso	Expresión cinética
1	Hidrólisis aerobia	$K_H M_{O_2} \frac{X_S/X_H}{K_X + X_S/X_H} I_{PH} X_H$
2	Hidrólisis anóxica	$K_H \eta_{NO_3} I_{O_2} M_{NO_3} \frac{X_S/X_H}{K_X + X_S/X_H} I_{PH} X_H$
3	Hidrólisis anaerobia	$K_H \eta_{Fe} I_{O_2} I_{NO_3} \frac{X_S/X_H}{K_X + X_S/X_H} I_{PH} X_H$
4	Crecimiento aerobio a partir de S_F	$\mu_H M_{O_2} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_F}{K_F + S_F} \frac{S_F}{S_F + S_A + S_{PRO}} I_{PH} X_H$
5	Crecimiento aerobio a partir de S_A	$\mu_H M_{O_2} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_A}{K_A + S_A} \frac{S_A}{S_F + S_A + S_{PRO}} I_{PH} X_H$
6	Crecimiento aerobio a partir de S_{PRO}	$\mu_H M_{O_2} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_{PRO}}{K_{PRO} + S_{PRO}} \frac{S_{PRO}}{S_F + S_A + S_{PRO}} I_{PH} X_H$
7	Crecimiento anóxico a partir de S_F	$\mu_H \eta_{NO_3} I_{O_2} M_{NO_3} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_F}{K_F + S_F} \frac{S_F}{S_F + S_A + S_{PRO}} I_{PH} X_H$
8	Crecimiento anóxico a partir de S_A	$\mu_H \eta_{NO_3} I_{O_2} M_{NO_3} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_A}{K_A + S_A} \frac{S_A}{S_F + S_A + S_{PRO}} I_{PH} X_H$
9	Crecimiento anóxico a partir de S_{PRO}	$\mu_H \eta_{NO_3} I_{O_2} M_{NO_3} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_{PRO}}{K_{PRO} + S_{PRO}} \frac{S_{PRO}}{S_F + S_A + S_{PRO}} I_{PH} X_H$
10	Lisis	$b_H X_H$
11	Almacenamiento de X_{PHA} a partir de S_A	$q_{PHA} \frac{S_A}{K_A + S_A} \frac{S_A}{S_A + S_{PRO}} \frac{X_{PP}/X_{PAO}}{K_{PP} + X_{PP}/X_{PAO}} X_{PAO}$
12	Almacenamiento de X_{PHA} a partir de S_{PRO}	$q_{PHA} \frac{S_{PRO}}{K_{PRO} + S_{PRO}} \frac{S_{PRO}}{S_A + S_{PRO}} \frac{X_{PP}/X_{PAO}}{K_{PP} + X_{PP}/X_{PAO}} X_{PAO}$
13	Almacenamiento aerobio de X_{PP}	$q_{PP} M_{O_2} \frac{S_{PO_4}}{K_{PS} + S_{PO_4}} \frac{X_{PHA}/X_{PAO}}{K_{PHA} + X_{PHA}/X_{PAO}} \frac{K_{MAX} - X_{PP}/X_{PAO}}{K_{IPP} + K_{MAX} - X_{PP}/X_{PAO}} I_{PH} X_{PAO}$
14	Crecimiento aerobio	$\mu_{PAO} M_{O_2} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{X_{PHA}/X_{PAO}}{K_{PHA} + X_{PHA}/X_{PAO}} I_{PH} X_{PAO}$
15	Almacenamiento anóxico de X_{PP}	$q_{PP} \eta_{NO_3} I_{O_2} M_{NO_3} \frac{S_{PO_4}}{K_{PS} + S_{PO_4}} \frac{X_{PHA}/X_{PAO}}{K_{PHA} + X_{PHA}/X_{PAO}} \frac{K_{MAX} - X_{PP}/X_{PAO}}{K_{IPP} + K_{MAX} - X_{PP}/X_{PAO}} I_{PH} X_{PAO}$
16	Crecimiento anóxico	$\mu_{PAO} \eta_{NO_3} I_{O_2} M_{NO_3} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{X_{PHA}/X_{PAO}}{K_{PHA} + X_{PHA}/X_{PAO}} I_{PH} X_{PAO}$
17	Lisis de X_{PAO}	$b_{PAO} X_{PAO} MIC$
18	Lisis de X_{PP}	$b_{PP} X_{PP} MIC$
19	Lisis de X_{PHA}	$b_{PHA} X_{PHA} MIC$
20	Nitrificación	$\mu_A M_{O_2} M_{PO_4} \frac{S_{NH_4}}{K_{NH_4} + S_{NH_4}} I_{PH} X_{AUT}$
21	Lisis	$b_A X_{AUT}$
22	Hidrólisis	$K_H I_{O_2} \frac{X_S/X_{ACID}}{K_X + X_S/X_{ACID}} I_{PH} X_{ACID}$
23	Fermentación	$\mu_{ACID} I_{O_2} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_F}{K_F + S_F} \frac{K_A}{K_A + S_A} \frac{K_{H_2}}{K_{H_2} + S_{H_2}} I_{PH} X_{ACID}$
24	Lisis	$b_{ACID} X_{ACID}$
25	Conversión de S_{PRO} en S_A	$\mu_{ACET} I_{O_2} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_{PRO}}{K_{PRO} + S_{PRO}} \frac{K_A}{K_A + S_A} \frac{K_{H_2}}{K_{H_2} + S_{H_2}} I_{PH} X_{PRO}$
26	Lisis	$b_{PRO} X_{PRO}$
27	Conversión de S_A en metano	$\mu_{MAC} I_{O_2} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_A}{K_A + S_A} I_{PH} X_{MAC}$
28	Lisis de X_{MAC}	$b_{MAC} X_{MAC}$
29	Conversión de H_2 en metano	$\mu_{MH_2} I_{O_2} M_{NH_4} M_{PO_4} \frac{S_{H_2}}{K_{H_2} + S_{H_2}} \frac{S_{IC}}{K_{IC} + S_{IC}} I_{PH} X_{MH_2}$
30	Lisis de X_{MH_2}	$b_{MH_2} X_{MH_2}$
31	Precipitación	$K_{PRE} S_{PO_4} X_{MEOH}$
32	Redisolución	$K_{RED} X_{MEP}$
33	Desabsorción de O_2	$KL_{aO_2} (S_{O_2} - S_{O_2}^*)$
34	Desabsorción de H_2	$KL_{aH_2} (S_{H_2} - S_{H_2}^*)$
35	Desabsorción de CH_4	$KL_{aCH_4} (S_{CH_4} - S_{CH_4}^*)$
36	Desabsorción de CO_2	$KL_{aCO_2} (S_{CO_2} - S_{CO_2}^*)$
37	Desabsorción de N_2	$KL_{aN_2} (S_{N_2} - S_{N_2}^*)$

1.6.2.5 Procesos gobernados por el equilibrio

El modelo BNRM1 incluye como procesos gobernados por el equilibrio las interacciones ácido-base en las que participan los componentes considerados. La Tabla 15 muestra todas las especies que se pueden formar mediante reacciones ácido-base en las que están implicados los componentes considerados. Esta tabla también muestra los valores de las constantes de equilibrio (T=25°C). Estos procesos gobernados por el equilibrio se describen mediante un conjunto de ecuaciones algebraicas que incluyen una expresión de la ley de acción de masas para cada una de las especies formadas en cada uno de los equilibrios y un balance de materia para cada uno de los componentes.

Tabla 15: Matriz de especies y componentes del equilibrio.

Especies	Componentes							Constante
	H ₂ O	H ⁺	NH ₄ ⁺	PO ₄ ⁻³	CO ₃ ⁻²	CH ₃ COO ⁻	CH ₃ CH ₂ COO ⁻	Log K
H ₂ O	1							0
H ⁺		1						0
NH ₄ ⁺			1					0
PO ₄ ⁻³				1				0
CO ₃ ⁻²					1			0
CH ₃ COO ⁻						1		0
CH ₃ CH ₂ COO ⁻							1	0
OH ⁻	1	-1						-13.998
NH ₃		-1	1					-9.252
HPO ₄ ⁻²		1		1				12.34
H ₂ PO ₄ ⁻		2		1				19.553
H ₃ PO ₄		3		1				21.7
HCO ₃ ⁻		1			1			10.33
H ₂ CO ₃		2			1			16.681
CH ₃ COOH		1				1		4.76
CH ₃ CH ₂ COOH		1					1	4.874

La ley de acción de masas para cada especie *i* está dada por la siguiente ecuación:

$$C_i = K_i \prod_{j=1}^N x_j^{a_{ij}}, \quad i=1, 2 \dots N \text{ (número de especies)} \quad \text{Ec. 9}$$

El balance de materia de cada componente está descrito por la siguiente expresión:

$$T_j = \sum_{i=1}^N a_{ij} C_i, \quad j=1, 2 \dots N \text{ (número de componentes)} \quad \text{Ec. 10}$$

C_i es la concentración de la especie i , x_j es la concentración del componente j (mol m^{-3}), a_{ij} es el coeficiente estequiométrico del componente j en la especie i y K_i es la constante de formación de la especie i corregida por las variaciones de la temperatura.

La resolución de estas ecuaciones algebraicas se efectúa mediante la aplicación del programa MINTEQA2, programa de cálculo del equilibrio químico que permite determinar las concentraciones de todas las especies presentes en el equilibrio. Para realizar este cálculo, el programa necesita un análisis químico del agua incluyendo las concentraciones totales de todos los componentes y otras medidas como temperatura, pH, etc.

La formulación matemática de los modelos biológicos alrededor de los balances de materia para las concentraciones totales de cada uno de los componentes considerados da lugar a un conjunto de ecuaciones diferenciales cuya integración respecto al tiempo proporciona los cambios en las concentraciones de los distintos componentes. En cada paso de tiempo las concentraciones de las diversas especies se calculan a partir de las expresiones algebraicas antes comentadas sin modificación alguna de las concentraciones de los componentes. Por tanto, el procedimiento de cálculo incluye la iteración secuencial entre las ecuaciones diferenciales y las ecuaciones algebraicas. Las concentraciones totales de los distintos componentes, necesarias para el cálculo del equilibrio, son calculadas mediante las ecuaciones diferenciales del modelo biológico.

1.7 PROCEDIMIENTOS DE CALIBRACIÓN DEL MODELO

La calibración de un modelo matemático consiste en determinar los parámetros característicos del mismo mediante la optimización de una función objetivo empleando algoritmos matemáticos específicos. En general, la función objetivo propuesta es la minimización de la suma del cuadrado del error, el cual viene dado por la diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo.

En determinados casos, en el proceso de optimización es posible obtener valores de los estados o de los parámetros del modelo sin un sentido físico. Esta problemática puede resolverse estableciendo restricciones al modelo las cuales establecen intervalos de variación de los parámetros y de las variables del modelo.

En la bibliografía es posible hallar numerosas metodologías para la calibración de los parámetros del modelo. A continuación se introducen procedimientos de calibración aplicables a los modelos que representan el tratamiento biológico del agua residual.

1.7.1 Metodologías de Calibración

Numerosos procedimientos de calibración se han publicado en la bibliografía. En este apartado se realiza una descripción de las principales metodologías empleadas en el procedimiento de calibración del modelo.

1.7.1.1 Calibración en Estado Estacionario

Este procedimiento consiste en emplear datos promedios del comportamiento de la EDAR, considerando que estos datos medios representan el estado estacionario de la planta. Esta clase de metodología de

calibración asocia todos los parámetros del modelo a un comportamiento estable de la planta (Penya-Roja y col., 2002; Manga y col., 2001).

Generalmente con una calibración del modelo en estado estacionario, solamente pueden ser determinados los parámetros responsables del comportamiento a largo plazo de la EDAR, como son los parámetros Y_H , f_P , b_H y la fracción X_I en el influente (Nowak y col., 1999). Estos parámetros están correlacionados en cierto grado, lo cual significa que la modificación del valor de un parámetro se puede compensar por una modificación en el valor de otro coeficiente. En el estudio de Nowak y col., (1999) a partir de los datos de balances de la planta se fijó el valor de Y_H y f_P , y de los datos en estado estacionario se determinó el valor de b_H y X_I . Makinia y col., (2005) determinaron a partir de la calibración en estado estacionario la edad del fango ajustando la relación X_S/X_I y el parámetro b_H . Las concentraciones de S_{NH_4} , S_{NO_3} en el reactor aerobio, las concentraciones de S_{PO_4} en el reactor anaerobio y en el efluente fueron ajustadas en la calibración en estado estacionario.

El procedimiento de calibración en estado estacionario permite la determinación experimental de parámetros que caracterizan el comportamiento de la EDAR en largos períodos de tiempo. Fundamentalmente, este procedimiento permite la identificación de parámetros asociados a la producción y composición de fangos.

1.7.1.2 Calibración Dinámica

Si el propósito del procedimiento de calibración es describir y predecir situaciones dinámicas a un corto plazo, será conveniente un procedimiento de calibración basado en datos dinámicos.

El procedimiento de calibración dinámica requiere que los datos se recojan con una determinada frecuencia de muestreo que depende de la constante de tiempo del proceso y de las variaciones del influente. El tiempo de retención

hidráulico (HRT) es una de las constantes de tiempo del sistema más importantes. Idealmente, el período de tiempo entre muestras no debe ser mayor a la quinta parte del HRT como así también el período de toma de muestras debe ser 3 a 4 veces esta constante de tiempo. Sin embargo, puesto que las medidas son relativamente costosas estas recomendaciones no siempre se logran cumplir.

En numerosos trabajos se emplea un procedimiento de calibración a partir de datos dinámicos. Rieger y col., (2001) llevan a cabo un procedimiento de calibración del módulo EAWAG Bio-P a partir de muestreos diurnos, semanales y mensuales de una EDAR. Makinia y col., (2006) aplican una exhaustiva calibración dinámica en un estudio de comparación del modelo ASM2d y ASM3P para simular el comportamiento de una EDAR.

Esta metodología de calibración se emplea generalmente para lograr una profundización en el conocimiento del comportamiento dinámico del sistema. Sin embargo, la implementación de esta metodología de calibración requiere un costoso trabajo experimental. El empleo de sondas permite aliviar el esfuerzo experimental que requiere esta metodología. Existen una serie de dispositivos que permiten la determinación de variables como S_{NO_3} , S_{NH_4} , SST, DQO, S_{PO_4} , etc., con las que se podrían muestrear zonas claves de la EDAR con una elevada frecuencia.

1.7.1.3 Calibración off-line en laboratorio

La información obtenida de la modalidad en estado estacionario o dinámica puede ser complementada con experiencias en laboratorio. Este tipo de metodología consiste en la calibración selectiva de los parámetros de elevada influencia del modelo matemático mediante experimentos en discontinuo (Penya Roja y col., 2002).

Estos ensayos se realizan en el laboratorio bajo condiciones muy controladas, con fango biológico e influente de la EDAR en estudio.

Consisten en experimentos específicamente diseñados para aislar los procesos biológicos, permitiendo de esta manera la calibración selectiva de los parámetros. Por esta razón se consideran calibraciones de tipo *off-line*. Existen diferentes métodos de calibración selectiva de parámetros. En general se emplean técnicas respirométricas, principalmente para evaluar parámetros de las bacterias heterótrofas, autótrofas y PAO aerobias.

La información experimental de las diferentes metodologías de calibración se combina para obtener información más precisa del sistema en estudio (Vanrolleghem y col., 2003). Rieger y col., (2001) implementaron un procedimiento iterativo para calibrar el módulo EAWAG Bio-P. Este procedimiento emplea datos de experimentos *off-line*, y de muestreos diurnos, semanales y mensuales de una EDAR. Los autores consideran que la calibración finaliza cuando el modelo permite interpretar toda la información experimental. Makinia y col., (2006) combinaron una calibración en estado estacionario con experiencias *off-line* del tipo NUR (velocidad de consumo de nitratos), OUR (velocidad de consumo de oxígeno) y AUR (velocidad de consumo de amonio), y datos dinámicos de una EDAR para la identificación de los parámetros del modelo.

Los procedimientos de calibración antes mencionados emplean métodos de optimización para la estimación de los parámetros del modelo matemático, basándose en la minimización del error cuadrático medio entre los datos simulados y experimentales. No obstante, pueden surgir problemas de identificabilidad de los parámetros asociados a la calidad de los datos experimentales y la complejidad del modelo biológico. En el apartado siguiente se introducen las técnicas que permiten abordar esta problemática.

1.7.2 Análisis de sensibilidad

La complejidad del modelo BNRM1 y la calidad de los datos experimentales plantean la problemática de “*identificabilidad del modelo*”, la cual puede ser teórica o práctica (Vanrolleghem y Dochain, 1998). La identificabilidad teórica es una característica de la estructura del modelo y considera si es posible obtener valores únicos de los parámetros para una estructura dada del mismo asumiendo medidas ideales. La identificabilidad práctica, por otra parte, está ligada a la calidad y la cantidad de mediciones disponibles para realizar la identificación de los parámetros. De esta manera, los parámetros teóricamente identificables pueden ser no identificables en la práctica.

En este trabajo de investigación es de particular interés la identificabilidad práctica de los parámetros, es decir la problemática asociada a la calidad y cantidad de datos experimentales. El *análisis de sensibilidad* es una herramienta muy empleada para abordar el problema de identificabilidad práctica. Este análisis permite determinar los parámetros más sensibles del modelo, es decir aquellos que ejercen una marcada influencia en la respuesta del modelo o a la inversa, identificar las variables de estado que no son sensibles a variaciones en los parámetros del modelo. Los valores de los parámetros que no muestren elevada sensibilidad se toman de datos publicados en la bibliografía. En cambio las variables de estado que no muestren elevada sensibilidad a las variaciones en los parámetros no se incluyen en las campañas de muestreo exhaustivo para adquisición de datos experimentales. Así mismo, mediante el análisis de sensibilidad es posible evaluar la identificabilidad de distintos subconjuntos de parámetros (que incluyen los más sensibles).

La sensibilidad paramétrica permite evaluar la influencia de cada parámetro en la respuesta del modelo. La sensibilidad paramétrica de un parámetro $p_j \in \mathbf{p}$ respecto a la variable de estado x_i se define como (Marsilli-Libelli y col., 2001):

$$s_{p_j}^{x_i} = \frac{\Delta x_i}{\Delta p_j} \frac{p_j^{NOM}}{x_i^{NOM}} \quad j=1 \dots P, \quad \text{Ec. 11}$$

\mathbf{p} es el vector de los parámetros, Δx_i es la variación del estado x_i cuando el parámetro p_j sufre una perturbación Δp_j . x_i^{NOM} es el valor nominal de x_i y p_j^{NOM} es el valor nominal de p_j . Afectar a Δx_i y a Δp_j por los valores nominales tiene el propósito de disminuir el peso relativo de los valores de la variable y del parámetro.

El análisis de sensibilidad es una herramienta que permite abordar diferentes problemáticas asociadas a la identificabilidad de los parámetros del modelo. A continuación se exponen dos aplicaciones muy importantes de dicho análisis.

1.7.2.1 Análisis de sensibilidad de los ensayos de calibración off-line

Los ensayos de calibración *off-line* permiten identificar en forma selectiva determinados parámetros característicos del proceso que se intenta aislar en el experimento. El análisis de sensibilidad se aplica para determinar los parámetros que más influyen en dicho ensayo como así también la existencia de colinealidades entre estos parámetros. Se considera que dos parámetros son colineales cuando el efecto de uno de ellos sobre la respuesta del modelo se anula por un cambio en el otro parámetro. La existencia de colinealidad en un conjunto de parámetros impide la identificación conjunta de los mismos a partir de los datos experimentales disponibles.

El análisis de sensibilidad de los ensayos de calibración *off-line* se lleva a cabo a partir del estudio de la sensibilidad paramétrica (Ec. 11) la cual se puede clasificar en estática y dinámica (Marsilli-Libelli y col., 2001). La primera se evalúa por medio de la derivada de x_i respecto al parámetro p_j y se aplica en los ensayos de calibración estáticos. Este tipo de ensayos se suelen implementar en la identificación de parámetros de las bacterias

heterótrofas y autótrofas. Por otro lado, la sensibilidad dinámica considera la evolución de la variable x_i en el tiempo. Esta sensibilidad da información respecto a la condición dinámica en la cual cada parámetro muestra la influencia más elevada en la respuesta del modelo. Los ensayos de calibración *off-line* que consideran la evolución de las variables de estado con respecto al tiempo se suelen implementar en la identificación de parámetros de las bacterias PAO.

El sistema dinámico que permite describir la evolución de las variables en el tiempo viene dado por la siguiente ecuación de estado:

$$\frac{dx_i(t)}{dt} = f_i(x(t), p) \quad \text{con } x_i(0) = x_{i0} \quad \text{Ec. 12}$$

Con $x_i \subset \mathbf{x}$ el vector compuesto por las variables del sistema. Se define la función de sensibilidad como:

$$S_{pj}^{x_i}(t) = \frac{\partial x_i(t)}{\partial p_j} \quad \text{Ec. 13}$$

Derivando respecto al tiempo la Ec. 13, se obtiene la expresión que describe la variación de la sensibilidad con el tiempo:

$$\frac{dS_{pj}^{x_i}(t)}{dt} = \left. \frac{\partial f(x, p, t)}{\partial x} \right|_{x_{\text{NOM}}} S_{pj}^{x_i}(t) + \frac{\partial f(x, p, t)}{\partial p_j} \quad \text{Ec. 14}$$

Esta función de sensibilidad depende del valor nominal de x_i . Para la implementación de la Ec. 14 se debe estimar la matriz Jacobiana J la cual está formada por las derivadas parciales de la función f_i respecto a cada variable x_i con $i=1..N$. Esta matriz J se calcula de la siguiente manera:

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \frac{\partial f_1}{\partial x_N} \\ \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} & \\ \frac{\partial f_N}{\partial x_1} & \frac{\partial f_N}{\partial x_N} & \end{bmatrix} \quad \text{Ec. 15}$$

Se considera que el valor inicial $S_{pj}^{xi}(0) = 0$ dado que en $t=0$ la variable x_i no depende del valor del parámetro. La función de la sensibilidad se normaliza de la siguiente forma:

$$S_{pj}^{xi}(t) = \frac{\partial x_i(t)}{\partial p_j} \frac{p_{jNOM}}{x_{iNOM}} \quad \text{Ec. 16}$$

A partir del análisis de sensibilidad de los ensayos de calibración *off-line* es posible realizar una optimización del experimento dado que: i) se acentúa el muestreo en el intervalo del experimento donde los parámetros sean más sensibles mejorando la identificabilidad de los mismos, ii) se determinan la existencia de colinealidades entre parámetros y iii) se considera, si fuera necesario, adquirir datos de otros estados que participen en las ecuaciones diferenciales del proceso en estudio y que mejoren la identificabilidad del sistema.

1.7.2.2 Análisis de sensibilidad en estado estacionario

El análisis de sensibilidad en estado estacionario se emplea habitualmente en la etapa previa a la calibración dinámica del modelo (Melcer y col, 2003; Vanrolleguem y col., 2003). En este procedimiento de calibración es necesario contar con un gran volumen de datos dinámicos del proceso para lograr una identificación adecuada de los parámetros. El análisis de sensibilidad en estado estacionario es una herramienta que permite determinar los parámetros que son potencialmente identificables a partir de los datos experimentales disponibles.

El análisis se realiza por medio de la simulación del proceso biológico y se denomina en estado estacionario porque se realiza en cierto punto de operación estable del proceso. Puesto que el tratamiento biológico está gobernado por procesos no lineales y que los modelos biológicos reflejan esta realidad, las sensibilidades de los parámetros dependerán de la estructura del modelo como así también del punto de operación en el cual se lleve a cabo el análisis de sensibilidad.

El análisis de sensibilidad en estado estacionario consiste en perturbar, uno por vez, cada parámetro p_j del modelo un Δp_j y proceder a la simulación del sistema. El resultado de esta simulación se emplea en el cálculo de la sensibilidad de la variable x_i respecto del parámetro p_j por medio de la Ec. 11. Vanrolleguen y col., (2003) proponen seleccionar las variables que intervienen en el análisis de sensibilidad de acuerdo al objetivo del procedimiento de calibración. Por ejemplo, si se propone optimizar la concentración de nitratos del efluente, el análisis de sensibilidad se debería realizar respecto a esta variable.

Las sensibilidades individuales permiten relacionar únicamente el parámetro p_j con la variable x_i . La medida de la sensibilidad δ_j permite determinar la importancia de cada parámetro p_j sobre todas las variables de estado consideradas en el análisis, la cual viene dada por la siguiente expresión (Brun y col., 2002):

$$\delta_j = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (s_{p_j}^{x_i})^2} \quad \text{Ec. 17}$$

Donde N es el conjunto de variables de estado consideradas en el análisis de sensibilidad en estado estacionario. δ_j determina la sensibilidad promedio de la respuesta del modelo a una perturbación en el valor del parámetro p_j , dado que considera cuanto influye un parámetro en todas las variables analizadas. Un valor alto de δ_j indica una importante influencia en el resultado de la simulación del modelo, en cambio un valor bajo indica que el parámetro analizado no ejerce influencia en la respuesta del modelo.

El orden de importancia de acuerdo a la medida de la sensibilidad da una idea del efecto de cada parámetro, considerado individualmente, sobre las salidas. Sin embargo, es necesario estudiar también la influencia conjunta de los parámetros, puesto que pueden presentarse problemas de colinealidad entre ellos. La existencia de colinealidad en un conjunto de parámetros impide la identificación conjunta de los mismos a partir de los datos experimentales disponibles. Esta problemática se puede estudiar a través del índice de colinealidad, el cual se define de la siguiente manera (Brun y col., 2002):

$$\gamma_K = \frac{1}{\min_{\|\beta\|=1} \|\tilde{\mathbf{S}}_K \beta\|} = \frac{1}{\sqrt{\tilde{\lambda}_K}} \quad \text{Ec. 18}$$

Donde $\tilde{\mathbf{S}}$ es la matriz normalizada de \mathbf{S} . \mathbf{S} está compuesta por las sensibilidades $s_{p_j}^{X_i}$ y cada elemento de la matriz $\tilde{\mathbf{S}}$ se obtiene de la siguiente forma:

$$\tilde{s}_{p_j}^{X_i} = \frac{s_{p_j}^{X_i}}{\|\mathbf{s}_j\|} \quad \text{Ec. 19}$$

Donde $\|\mathbf{s}_j\|$ es la norma euclideana de la columna j de \mathbf{S} . $\tilde{\mathbf{S}}_K$ es una submatriz de tamaño $N \times K$ de la matriz $\tilde{\mathbf{S}}$. $\tilde{\mathbf{S}}_K$ contiene K columnas que corresponden a los parámetros del conjunto K . β es un vector de coeficientes de longitud K y $\tilde{\lambda}_K$ es el autovalor más pequeño de $\tilde{\mathbf{S}}_K^T \times \tilde{\mathbf{S}}_K$. El índice de colinealidad mide la dependencia lineal entre los parámetros del conjunto K . Si los parámetros del conjunto K analizado son próximos a ser linealmente dependientes, un cambio en un parámetro puede ser compensado por un cambio en otro parámetro del conjunto K , generando un valor elevado de γ_K . Se considera que un $\gamma_K > 10$ implica que el subconjunto K es colineal y no puede identificarse a partir de los datos experimentales disponibles.

La medida del determinante se define de la siguiente forma:

$$\rho_K = \det(S_K^T S_K)^{1/2k} = \left(\prod_{j=1}^k \lambda_j \right)^{1/2k} \quad \text{Ec. 20}$$

$\det(\)$ es la función de cálculo del determinante y λ_j es un autovalor de la matriz $S_K^T S_K$. ρ_K combina la información contenida en la medida de la sensibilidad, δ_j , y en el coeficiente de colinealidad, γ_K . El producto de los autovalores es alto si δ_j es elevado y γ_K es bajo, con lo cual el conjunto de parámetros K es identificable a partir de los datos experimentales disponibles. Por otro lado, el coeficiente ρ_K resulta bajo si se tiene un valor elevado de γ_K y un valor bajo de δ_j . En esta situación no es posible lograr una adecuada identificación de los parámetros del conjunto K a partir de los datos experimentales disponibles.

1.7.3 Protocolos de Calibración

En la literatura es posible hallar numerosos procedimientos de calibración que involucran los modelos ASM en los cuales se combinan las herramientas de calibración y análisis de sensibilidad descritos en los apartados anteriores. Sin embargo, se ha observado que no existe una base común en todas estas propuestas lo cual conduce a una dificultad para comparar la calidad de la información obtenida de cada metodología. Dada la gran variedad de metodologías propuestas y la dificultad del proceso se han propuesto protocolos sistemáticos para abordar la calibración de este tipo de modelos. A continuación se da una breve descripción de los protocolos más destacados.

1.7.3.1 Protocolo de Calibración BIOMATH

Este protocolo (Vanrolleghem y col., 2003) está organizado en 4 etapas, las cuales se describen brevemente a continuación:

Etapa 1: Establecer el objetivo del procedimiento de calibración. En esta etapa, a partir del objetivo, se debe considerar qué información experimental se requiere.

Etapa 2: Estudio y caracterización de la planta. En esta etapa se debe identificar la configuración de la planta y su funcionamiento, los parámetros operacionales, las concentraciones de las diferentes componentes del influente y del efluente. Los datos obtenidos de la caracterización se deben evaluar mediante balances de materia antes de emplearlos en el procedimiento de calibración.

El modelo de la planta se considera que está formado por tres componentes: 1) el modelo de transferencia de masa e hidráulico, 2) modelo de sedimentación y 3) modelo biológico, cada uno de los cuales se calibran primero en forma separada empleando los datos recogidos experimentalmente de la planta. Se recomienda el diseño óptimo de experimentos el cual permite planificar la campaña de muestreo sobre una base cuantitativa y objetiva para maximizar la información contenida en los datos y disminuir el costo experimental.

Etapa 3: En esta etapa se lleva a cabo la calibración en estado estacionario de la planta, a partir de los parámetros calibrados en cada submodelo. El objetivo de esta calibración es obtener un buen ajuste de la producción promedio de fango y consumo de oxígeno de la planta. El conjunto de parámetros que se calibra en esta etapa se establece a partir del análisis de sensibilidad.

Etapa 4: Calibración dinámica del modelo completo de la planta, para lo cual se recogen datos dinámicos con una elevada frecuencia de muestreo. Los parámetros a calibrar en esta etapa se deciden a partir del análisis de sensibilidad. Las variables consideradas en este análisis dependen del objetivo fijado inicialmente. Los experimentos realizados en laboratorio pueden emplearse para estimar algunos parámetros que pueden ser considerados posteriormente en la calibración dinámica.

Finalmente se debe proceder a validar el modelo empleando un conjunto de datos recogidos en diferentes condiciones de trabajo de la EDAR. Si las predicciones del modelo no son adecuadas se repite el procedimiento de calibración desde la etapa 2.

1.7.3.2 Protocolo de Calibración STOWA

Este protocolo (Hulsbeek y col., 2002) consta de varias etapas las cuales de describen brevemente a continuación:

Etapa 1: En esta etapa se decide el objetivo del estudio, que puede consistir en: 1) diseño de la planta, 2) optimización de una EDAR existente y 3) desarrollo de estrategias de control para EDAR nuevas o existentes.

Etapa 2: Descripción del proceso. Esta etapa consiste en identificar las diferentes partes del proceso: fangos activados, clarificadores, corrientes de entrada, salida y recirculaciones.

Etapa 3: Campaña de muestreo y verificación de los datos experimentales. La verificación de la calidad de estos datos se realiza empleando balances de materia.

Etapa 4: En esta etapa se define el modelo que describe el comportamiento de la EDAR. Para esto se deben considerar los diferentes submodelos: hidráulico, de sedimentación, y biológico.

Etapa 5: Caracterización de las diferentes corrientes de la planta. En esta etapa se emplean datos históricos o nuevas mediciones para caracterizar el influente, efluente y las corrientes de recirculación, empleando el método propuesto por Roeleveld y van Loosdrecht (2002). El propósito final del procedimiento de calibración determina la frecuencia del muestreo y la duración del mismo.

Etapa 6: Calibración del modelo. Se realiza una calibración inicial en la cual se comparan los datos simulados y experimentales. Si existen discrepancias entre el modelo y las mediciones se deben revisar nuevamente los datos experimentales y los balances de masa. Este protocolo propone un procedimiento de calibración manual en el cual se ajustan parámetros de diferentes procesos biológicos de uno en uno. En primer lugar se ajustan los parámetros que caracterizan la producción y composición del fango: X_S , X_I , i_{NX} y i_{NI} . En segundo lugar los que controlan el proceso de nitrificación considerando para esto la concentración de amonio del efluente: K_{O_2} , K_{NH_4} y b_{AUT} . Por último los parámetros que determinan la concentración de nitratos en el efluente: η_{NO_3} , b_H , K_{O_2} , K_{NO_3} y K_{OH} . Este procedimiento es iterativo, hasta obtener una adecuada representación del comportamiento de la planta.

Finalmente se lleva a cabo la validación del modelo para lo cual se emplea un conjunto de datos diferentes a los utilizados en el procedimiento de calibración.

1.7.3.3 Protocolo de Calibración HSG

El protocolo HSG (Langergraber y col., 2004) está compuesto por las siguientes etapas:

Etapa 1: Determinar los objetivos del procedimiento de calibración.

Etapa 2: Colección de datos y selección del modelo. En esta etapa es importante recoger toda la información de la planta respecto a configuración, operación y funcionamiento. Se selecciona además el modelo a considerar, el cual estará compuesto de diferentes submodelos: biológico, hidráulico, de sedimentación y de control.

Etapa 3: Esta consiste en la verificación de los datos experimentales. El protocolo aconseja estudiar cuidadosamente las fuentes posibles de error

como así también verificar la calidad de los datos experimentales mediante la implementación de balances de masa.

Etapa 4: Una vez que el funcionamiento de la planta ha sido verificado se lleva a cabo una simulación previa en estado estacionario. En esta etapa se realiza un análisis de sensibilidad para determinar los parámetros más influyentes en la respuesta del modelo. En función del objetivo propuesto y de los resultados obtenidos en la simulación previa se decide la modalidad (duración y frecuencia) empleada para la campaña de muestreo.

Etapa 5: Se recogen los datos que se emplearán en la calibración del modelo. Incluye un muestreo exhaustivo de la planta durante 10 días. La calidad de los datos recogidos en esta etapa se debe evaluar mediante balances de masa. El influente se caracteriza por medio de la metodología propuesta por Roeleveld y van Loosdrecht (2002) y se calibran determinados parámetros mediante experimentos en laboratorio.

Etapa 6: Empleando los datos de la etapa anterior se procede con la calibración del modelo. La condición inicial del proceso de calibración se determina mediante la simulación del comportamiento de la planta durante varias semanas.

La calibración se realiza modificando los parámetros con elevada sensibilidad que no se hayan determinado en experimentos o no se tenga conocimiento previo del valor de los mismos. Se comparan los datos simulados con los experimentales y se modifican los parámetros uno por vez. Este procedimiento propone un orden de los parámetros a ajustar: 1) estructura del modelo e hidráulica de la planta, 2) componentes del influente y 3) parámetros biocinéticos del modelo biológico. Se realiza en forma iterativa hasta alcanzar un adecuado ajuste de los datos experimentales.

Etapa 7: Se valida el modelo empleando un conjunto diferente de datos. Posteriormente se simula el modelo calibrado empleando diferentes

escenarios, evaluando los resultados de la simulación en función del objetivo inicial. El protocolo aconseja realizar una evaluación cuidadosa de los pasos seguidos durante el procedimiento hasta alcanzar una calibración y validación adecuada del modelo.

1.7.3.4 Protocolo de Calibración WERF

El protocolo WERF (Melcer y col., 2003) propone diferentes alternativas según la EDAR que se analice y los objetivos que se deban cumplir. Si bien no presenta un esquema general como los anteriores, puede considerarse que este protocolo sigue en cada caso las siguientes etapas:

Etapa 1: Se simula el comportamiento de la planta para lo cual es necesario conocer la configuración de la misma, los datos del influente y del funcionamiento de la EDAR.

Etapa 2: Se recogen datos de la EDAR en estudio. Este paso incluye la recopilación de datos históricos como así también nuevas medidas.

Etapa 3: En esta etapa se lleva a cabo la calibración de la planta, la cual dependerá del objetivo buscado. Este protocolo propone cuatro niveles de calibración, comenzando con un nivel sencillo, avanzando posteriormente hacia un procedimiento más complejo según el objetivo final.

La metodología de calibración más sencilla consiste en emplear valores por defecto de los parámetros como así también suposiciones generales del modelo. Esta metodología puede emplearse para diseñar una planta de la cual no se tiene información acerca del proceso y del influente. El siguiente nivel de calibración considera el empleo de datos históricos para este fin. En este paso se deben verificar los datos experimentales mediante balances de masa. El nivel de calibración 3 mejora el procedimiento al incorporar datos dinámicos provenientes de una campaña exhaustiva de muestreo de la EDAR. Se aconseja además incorporar datos obtenidos de períodos de

tiempo en los que la planta esté sometida a condiciones extremas (influyente con elevada carga, exceso de carga en los clarificadores, etc.). El nivel de calibración 4 incorpora mediciones directas de los parámetros. Este nivel se aconseja cuando el tercer nivel no ha dado resultados adecuados.

Etapa 4: El cuarto paso es la validación modelo.

1.7.3.5 Semejanzas y diferencias entre los protocolos de calibración

Los cuatro protocolos comparten algunos aspectos los cuales se mencionan a continuación:

- 1- Definir un claro objetivo del procedimiento de calibración. El propósito condiciona los pasos a seguir, determinando el empleo final del modelo calibrado: diseño de una planta nueva, optimización de una EDAR que esté en funcionamiento, establecer una estrategia de control, etc.
- 2- Estudiar la configuración, caudales de recirculación, funcionamiento y parámetros operacionales de la planta.
- 3- Realizar una evaluación del funcionamiento de la planta mediante la recolección exhaustiva de datos históricos. En esta etapa es importante evaluar estos datos experimentales mediante la implementación de balances de masa. Si los datos no verifican estos balances no podrán ser empleados en el procedimiento de calibración.
- 4- Estudiar el modelo que permite representar el comportamiento global de la EDAR para lo cual es importante considerar los diferentes submodelos: hidráulico, de sedimentación y biológico.
- 5- Realizar una etapa de validación empleando un conjunto diferente de datos experimentales del utilizado en la calibración.

Si bien existen semejanzas entre los protocolos analizados, es posible observar que el procedimiento de calibración del modelo varía apreciablemente entre las distintas propuestas. A continuación se detallan

aspectos importantes de dicho procedimiento, algunos de los cuales se consideran relevantes para el presente trabajo de investigación:

- 1- La simulación en estado estacionario permite evaluar, a partir de datos históricos, el comportamiento de la planta así como la factibilidad del modelo considerado. Esta simulación puede ser empleada para determinar los parámetros que influyen sobre la producción de fango.
- 2- El análisis de sensibilidad en estado estacionario o dinámico es una herramienta fundamental para determinar los parámetros más sensibles.
- 3- La calibración dinámica se emplea en la identificación de parámetros sensibles puesto que la EDAR está sometida a continuas variaciones del influente. La implementación de esta metodología requiere un elevado número de datos, con lo cual se debe planificar cuidadosamente la campaña de muestreo exhaustiva (frecuencia y duración) en función del objetivo final de la calibración.
- 4- Algunos parámetros pueden ser identificados mediante experimentos en laboratorio a partir de análisis respirométricos. Sin embargo, la gran mayoría se identifica a partir del procedimiento de calibración dinámica.

1.8 CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL

Un aspecto fundamental en la aplicación del modelo es el conocimiento del contenido de todos los contaminantes presentes en el agua residual que son depurados en la planta de tratamiento. Los contaminantes materia orgánica, fósforo y nitrógeno, pueden ser determinados experimentalmente por una variedad de procedimientos de caracterización. Este apartado recoge diferentes metodologías del procedimiento de caracterización del agua residual, destacando el de la materia orgánica.

La materia orgánica puede ser caracterizada mediante métodos físico-químicos y biológicos. En general se aplica una combinación de ambas metodologías para lograr la determinación de todas las fracciones de materia orgánica presentes en el agua residual.

El microorganismo que juega un papel fundamental en el proceso de depuración es la bacteria. Esto ha conducido a establecer una clasificación de las fracciones de materia orgánica basada en lo que puede o no consumir este microorganismo. A continuación se dará una breve descripción de los mecanismos que permiten la entrada de sustratos al interior celular bacteriano iniciando de esta manera el metabolismo.

1.8.1 Transporte de sustratos a través de la membrana celular

La célula está rodeada de una membrana plasmática o celular que regula el intercambio de iones y moléculas entre el espacio intracelular y el extracelular. Esta membrana está constituida por una bicapa de fosfolípidos. Estos compuestos son anfipáticos, es decir poseen una cabeza polar y dos cadenas hidrofóbicas hidrocarbonadas generalmente representadas por dos ácidos grasos de longitud variable. La cabeza polar hidrofílica se orienta hacia el espacio acuoso y las cadenas hidrofóbicas hacia el interior de la membrana. También existen diferentes tipos de proteínas presentes en la membrana y glúcidos los cuales se encuentran unidos a las proteínas y a los fosfolípidos.

La permeabilidad de la membrana es fundamental para el funcionamiento de la célula viva y para el mantenimiento de condiciones fisiológicas intracelulares adecuadas. Esta función determina qué sustancias pueden penetrar en el interior de la célula, muchas de las cuales son necesarias para mantener los procesos vitales y la síntesis de sustancias. También regula el paso del agua y la salida de productos de deshecho.

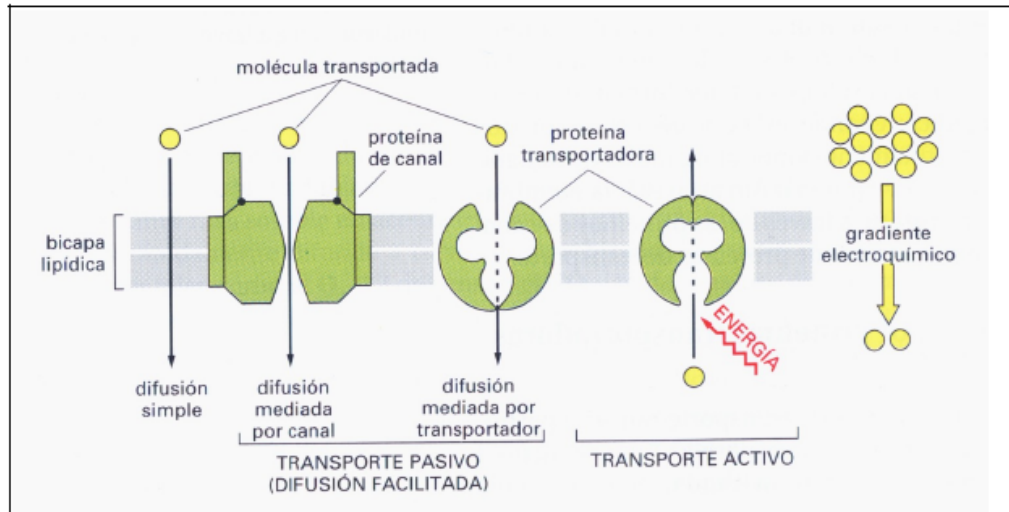


Figura 12: Mecanismos de transporte a través de la membrana celular. (De Robertis y col., 1998).

El transporte de los iones y moléculas relativamente pequeñas ocurre por diferentes mecanismos. En la Figura 12 se encuentran esquematizados los mecanismos más importantes los cuales se describen brevemente a continuación:

- i) Difusión simple: Ocurre a favor del gradiente electroquímico a través de la bicapa de fosfolípidos sin gasto de energía. Moléculas pequeñas no polares o hidrofóbicas se difunden rápidamente a través de las membranas. Penetran más fácilmente cuanto menor es la molécula y mayor su liposolubilidad. De esta manera gases como el O_2 , CO_2 , N_2 y benceno se pueden difundir a través de la membrana. Las moléculas hidrofílicas polares que no posean carga neta se pueden difundir también como es el caso del agua, metanol, etanol, urea y glicerol.
- ii) Difusión mediada: Iones y determinadas moléculas más grandes pueden atravesar la membrana a favor del gradiente electroquímico. En este caso es necesaria la presencia de proteínas transportadoras especiales: canales iónicos y permeasas. Los canales iónicos permiten el paso de iones, siendo altamente selectivos, y las permeasas permiten el paso de moléculas más grandes como es el caso de

monosacáridos.

iii) Transporte activo: Cuando el transporte debe hacerse en contra del gradiente de concentración es necesario emplear energía. Esta energía puede provenir del ATP, transporte activo primario, o del co-transporte de un ión o molécula diferente que atraviesa de manera simultánea la membrana a favor del gradiente de concentración.

1.8.2 Caracterización de la materia orgánica

Una parte del agua residual, considerada biodegradable, puede ser consumida por la bacteria. Sin embargo, solamente puede penetrar rápidamente al interior celular la fracción compuesta por moléculas pequeñas que atraviesan la membrana celular por alguno de los mecanismos mencionados en el apartado anterior. Esta fracción se denomina materia orgánica rápidamente biodegradable (S_S). La fracción de materia orgánica con un tamaño superior necesitará un proceso de hidrólisis previo que le permita llegar al interior celular a través de las proteínas transportadoras. Esta fracción ha sido llamada materia orgánica lentamente biodegradable (X_S). La fracción de materia orgánica que no puede ser utilizada por las bacterias se denomina no biodegradable. Esta componente inerte también ha sido clasificada en soluble (S_I) y particulada (X_I). Todas estas fracciones están expresadas en términos de DQO (demanda química de oxígeno). De esta manera se tiene:

$$DQO_T = DQO_{\text{soluble}} + DQO_{\text{particulada}} \quad \text{Ec. 21}$$

siendo $DQO_{\text{soluble}} = S_S + S_I$ y $DQO_{\text{particulada}} = X_S + X_I$.

El modelo BNRM1 no considera la presencia de microorganismos en el influente.

Existen diferentes metodologías para caracterizar las componentes de la materia orgánica presentes en el agua residual las cuales se pueden agrupar

en métodos físico-químicos y biológicos. A continuación se expondrán numerosas propuestas publicadas en la bibliografía.

1.8.2.1 Caracterización Físico-Química del agua residual

El agua residual puede ser separada en diferentes componentes, empleando un método sencillo de filtración. La propuesta se basa en que el tamaño molecular es un indicador de la biodegradabilidad de la materia orgánica. Las moléculas pequeñas pueden ser inmediatamente asimiladas e incorporadas al interior celular, mientras que compuestos de mayor tamaño deben ser sometidos a una hidrólisis que permitirá la obtención de fragmentos pequeños asimilables por los microorganismos. La distribución de tamaños de los compuestos presentes en el agua residual se divide en cuatro clases (Levine y col., 1991):

Decantable	> 100 μm
Supracoloidal	1 –100 μm
Coloidal	0.001–1 μm
Soluble	< 0.001 μm

La fracción verdaderamente soluble debe ser capaz de atravesar la membrana celular rápidamente a través de las proteínas transportadoras las cuales tienen un canal libre de paso de aproximadamente 0.001 μm . Las moléculas con un tamaño molecular entre 600 y 5000 Da (Dalton) pueden atravesar la membrana celular mediante las proteínas transportadoras (Hu y col., 2002). Dichas moléculas son ácidos grasos volátiles, carbohidratos simples, alcoholes, amino ácidos, etc., (Orhon y Cokgör, 1997).

El método de caracterización basado en la separación por medio de la filtración es relativamente sencillo de aplicar y presenta una amplia difusión en la bibliografía. Sin embargo, la elección del tamaño de filtro es el factor clave de dicha metodología. Los filtros con un tamaño de poro de 0.45 y 0.1 μm son habitualmente empleados en el fraccionamiento físico-químico

del agua residual. En diversos trabajos (Ekama y col., 1986; Makinia y col., 2005; Insel y col., 2006) se emplea el filtro de $0.45\ \mu\text{m}$ para llevar a cabo el fraccionamiento de la materia orgánica. La directiva 91/271/CEE del Consejo de 21 de mayo de 1991 sobre Tratamiento de las aguas residuales urbanas establece la utilización de este tamaño de filtro para la separación de los sólidos suspendidos totales. No obstante, diversos autores consideran que el tamaño de filtro de $0.1\ \mu\text{m}$ permite la separación de la materia rápidamente biodegradable (Roeleveld y Van Loosdrecht, 2002; Melcer y col., 2003). Cabe destacar que el modelo ASM2 (Henze y col., 1999) no presenta una postura clara del tamaño de filtro a emplear. Únicamente menciona que puede emplearse un tamaño entre 0.45 y $1.8\ \mu\text{m}$ para separar la fracción soluble de la particulada.

Es posible notar que los tamaños de filtro habitualmente empleados en la caracterización físico-química son notablemente superiores al canal libre de paso de las proteínas transportadoras ($0.001\ \mu\text{m}$) las cuales permiten el ingreso del sustrato biodegradable al interior celular.

A continuación se expondrán diferentes metodologías basadas en la separación física por filtración para la cuantificación de las componentes del agua residual.

1.8.2.1.1 Fracción de materia orgánica soluble no biodegradable, S_I

El modelo BNRM1 considera que la componente S_I está presente en el agua residual y que además se produce durante el proceso de depuración por medio de la hidrólisis de la fracción X_S . El coeficiente f_{S_I} indica cuánto aumenta la fracción S_I por este proceso de hidrólisis. Esto conduce a que el contenido de S_I del efluente sea mayor al que entra en la planta. A continuación se mencionan los métodos más utilizados para cuantificar dicha componente:

Siegrist y Tschui, (1992) tienen en cuenta la producción de material inerte soluble en el proceso de tratamiento del agua residual.

$$S_I = 0.9 \times (DQO_{\text{soluble efluente}} - DBO_{\text{soluble L efluente}}) \quad \text{Ec. 22}$$

Donde DBO es la demanda bioquímica de oxígeno, y el subíndice L indica la DBO límite, obtenida al cabo de 20 días.

Wentzel y col., (1999) proponen la aireación del agua residual hasta que el registro de OUR (velocidad de consumo de oxígeno) sea constante. Se toma 1 litro de agua residual del reactor, y se aplica: a) floculación con sulfato de aluminio, b) filtración por fibra de vidrio y c) filtración por filtro de 0.45 μm . De esta fracción se determina la DQO soluble, obteniéndose S_I .

Roeleveld y van Loosdrecht, (2002) basado en el método de caracterización STOWA proponen:

$$S_I = 0.9 \times DQO_{\text{soluble efluente}} \quad \text{Ec. 23}$$

La Ec. 23 se emplea en plantas de tratamiento que operan a baja carga. En este caso, la producción de microorganismos es pobre, con lo cual se produce poco material inerte o “debris”.

$$S_I = 0.9 \times DQO_{\text{soluble efluente}} - 1.5 \times DBO_{5 \text{ efluente}} \quad \text{Ec. 24}$$

La Ec. 24 se utiliza en plantas de tratamiento que operan con una carga elevada, en las cuales la producción de fangos es importante.

Penya-Roja y col., (2002) a partir de los valores medidos en una planta piloto de tratamiento de las aguas residuales en cuestión, proponen:

$$S_I = DQO_{\text{soluble efluente}} - DBO_{\text{soluble L efluente}} \quad \text{Ec. 25}$$

Sin, 2004, sugiere calcular la fracción de materia orgánica soluble inerte mediante la siguiente ecuación:

$$S_I = (DQO_{\text{soluble efluente}} - S_{S \text{ efluente}}) - 0.1 DQO_{\text{consumido}} \quad \text{Ec. 26}$$

siendo $DQO_{\text{consumido}}$ la DQO consumida en el tanque de aireación. Esta metodología considera la producción de debris durante el proceso. La fracción $S_{S \text{ efluente}}$ se obtiene con la siguiente ecuación:

$$S_{S \text{ efluente}} = F_{\text{DBO/DQO,efluente}} \times DQO_{\text{total efluente}} / (1-Y) \quad \text{Ec. 27}$$

Y es un rendimiento del método de DBO, el cual se asume igual a 0.2, y:

$$F_{\text{DBO/DQO,efluente}} = \text{promedio} (DBO_{5,\text{efluente}} / DQO_{\text{total efluente}}) \quad \text{Ec. 28}$$

Este autor sugiere que se realice un cálculo semanal de este factor.

Se observa que clasificar un método como puramente físico-químico para la obtención de S_I es una tarea difícil, dado que en la mayoría es necesario contar con el valor de la DBO del efluente, el cual es un método biológico. Otro aspecto importante a destacar es determinar en qué condiciones se puede despreciar la producción de S_I en el proceso de depuración con fangos activados.

1.8.2.1.2 Fracción de materia orgánica rápidamente biodegradable, S_S

El procedimiento más aceptado para obtener esta fracción es restar a la DQO soluble de la entrada la fracción S_I obtenida en el apartado anterior es decir:

$$S_S = DQO_{\text{soluble influente}} - S_I \quad \text{Ec. 29}$$

Esta metodología es empleada por Peña-Roja y col., (2002), y Roeleveld y van Loosdrecht, (2002).

1.8.2.1.3 Fracción de materia orgánica particulada no biodegradable, X_I

Esta componente se puede determinar de la siguiente manera:

Henze y col., (1987) El modelo ASM2 propone ajustar esta fracción por medio de la comparación de los datos simulados de producción de fangos con los experimentales.

Penya-Roja y col., (2002) plantean calcular esta fracción de la siguiente manera:

$$X_I = DQO_{\text{total influyente}} - DBO_{\text{total L influyente}} - S_I \quad \text{Ec. 30}$$

Roeleveld y van Loosdrecht, (2002) calculan esta fracción a través del balance de DQO_{total} de la siguiente manera:

$$X_I = DQO_{\text{total influyente}} - X_S - S_S - S_I \quad \text{Ec. 31}$$

En el apartado siguiente se describe como obtienen estos autores la fracción X_S .

Sin, 2004 obtiene la fracción X_I por medio de la simulación de la producción de fangos, comparando estos datos con los obtenidos experimentalmente. Este autor considera que la fracción X_I es un componente de ajuste en la calibración del modelo.

1.8.2.1.4 Fracción de materia orgánica lentamente biodegradable, X_S

Penya-Roja y col., (2002) obtienen esta fracción a partir del balance de DQO:

$$X_S = DQO_{\text{total influyente}} - X_I - S_I - S_S \quad \text{Ec. 32}$$

Roeleveld y van Loosdrecht, (2002) calculan esta fracción de la $DBO_{\text{total L influyente}}$ corregida. Este ajuste al valor de la $DBO_{\text{total L influyente}}$ se basa en considerar la formación de “debris” durante el ensayo de DBO. La materia

orgánica presente se consume para formar biomasa, la cual por lisis celular genera material inerte. Para considerar la formación de esta fracción inerte se corrige la DBO total real del influente de la siguiente manera:

$$X_S = \text{BDBO} = \frac{1}{1 - f_{\text{DBO}}} \text{DBO}_{L, \text{total afluente}} - S_S \quad \text{Ec. 33}$$

El valor del factor es $f_{\text{DBO}} = 0.1 - 0.2$

1.8.2.2 Caracterización biológica

Esta metodología permite determinar las componentes biodegradables del agua residual. Para esta tarea dos procedimientos son ampliamente empleados: la determinación experimental de la DBO y el análisis respirométrico. A continuación se dará una descripción de su implementación.

1.8.2.2.1 Determinación de DBO

El método biológico que históricamente se ha empleado para determinar la materia orgánica biodegradable es la DBO durante un período de incubación de 5 a 7 días. Sin embargo, la DBO_5 o DBO_7 sólo cuantifican entre un 50 y un 95% de la DQO total biodegradable, dependiendo de la proporción de materia orgánica rápidamente biodegradable respecto a la lentamente biodegradable. Esta proporción condiciona la constante de reacción que caracteriza cada curva de DBO (Cutrera y col., 1999). Para determinar la cantidad total de materia orgánica se debe ampliar el período de incubación a 20 días, obteniéndose la DBO_{20} . Esta metodología no resulta práctica en el caso de determinaciones rutinarias de plantas de tratamiento de aguas residuales.

El ensayo de DBO se emplea en general acompañando el método físico-químico dado que permite determinar de la fracción total del influente su

componente biodegradable. De esta manera se completa el fraccionamiento físico-químico.

A continuación se da un breve detalle de un método de caracterización que permite obtener las fracciones de materia orgánica no biodegradables (S_I y X_I) a partir de los datos de DBO.

Boursier y col., (2005) obtienen la componente S_I a partir de un ensayo de DBO.

$$S_I = DQO_{\text{soluble}} (DBO_{L \text{ TOTAL ENTRADA}}) \quad \text{Ec. 34}$$

Es decir se realiza un test de DBO del influente total y una vez finalizado se determina el contenido de DQO soluble. En esta propuesta se considera que durante el procedimiento no se genera S_I .

Además a través de la determinación experimental de la DBO propone obtener la fracción no biodegradable particulada de la siguiente manera:

$$X_I = \frac{DQO_{\text{TOTAL}} (DBO_{L \text{ TOTAL INF}}) - Y_{XP} DQO_{\text{TOTAL INF}}}{1 - Y_{XP}} - S_I \quad \text{Ec. 35}$$

siendo

$$Y_{XP} = \frac{DQO_{\text{TOTAL}} (DBO_{L \text{ SOL INF}}) - DQO_{\text{SOL}} (DBO_{L \text{ SOL INF}})}{DQO_{\text{SOL INF}} - DQO_{\text{SOL}} (DBO_{L \text{ SOL INF}})} \quad \text{Ec. 36}$$

1.8.2.2.2 Análisis respirométrico

Por respirometría se entiende la medición de la velocidad consumo de oxígeno (OUR) (Sperandio y Paul, 2000; Orhon y Okutman, 2003; Boursier y col., 2005) o de nitratos (NUR) (Ekama y col., 1986), siendo el primero de mayor aplicación. El dispositivo experimental empleado en la determinación de OUR recibe el nombre de *respirómetro*, y el perfil de oxígeno disuelto (OD) frente al tiempo registrado por dicho dispositivo se denomina

respirograma. El análisis respirométrico se emplea en general en procedimientos de caracterización del agua residual como así también en ensayos destinados a la estimación de parámetros del modelo biológico. A continuación se da un breve detalle de las fracciones del agua residual que se obtienen a partir del análisis respirométrico.

a. Fracción de materia orgánica rápidamente biodegradable S_s

En general, el análisis respirométrico que permite determinar esta fracción se lleva a cabo en discontinuo con fango en condición endógena tras la adición de una determinada proporción del agua residual a analizar. El valor inicial de OUR es generalmente elevado debido a la presencia de materia orgánica rápidamente biodegradable. A medida que esta componente es consumida por los microorganismos el valor de OUR disminuye. En la Figura 13 se muestra un registro de OUR. En la gráfica, la zona gris representa el consumo de oxígeno debido a la materia orgánica rápidamente biodegradable añadida.

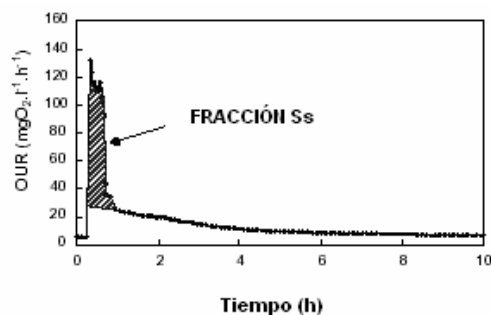


Figura 13: Fracción S_s . Boursier y col., (2005).

A partir de los datos experimentales de OUR se obtiene el consumo de oxígeno del análisis mediante el cálculo del área de la curva de OUR (Ekama, y col., 1986; Wentzel y col., 1999; Nuhoglu y col., 2004; Sin, 2004; Boursier, y col., 2005). Finalmente la fracción S_s se obtiene de la siguiente ecuación:

$$S_s = \frac{1}{(1 - Y_H)} \int_0^{t_{\text{final}}} \text{OUR} \, dt \quad \text{Ec. 37}$$

El análisis respirométrico desempeña un papel fundamental en los procedimientos de caracterización. Su implementación experimental no presenta una elevada complejidad y permite una obtención relativamente rápida de los resultados. Sin embargo, para el desarrollo de esta metodología es necesario conocer el rendimiento de las bacterias heterótrofas Y_H .

Otro aspecto fundamental a tener en cuenta en el análisis respirométrico es la relación inicial de sustrato/biomasa del experimento, la cual viene dada por el cociente F_0/X_0 . La calidad de la información del análisis respirométrico depende fundamentalmente del valor de este cociente el cual establece la forma final de la curva de la OUR. En la bibliografía es posible encontrar distintas propuestas para determinar la fracción S_S mediante análisis respirométricos en las cuales se emplean diferentes valores iniciales del cociente F_0/X_0 . La información publicada se puede organizar según el rango de variación de F_0/X_0 .

1-Análisis respirométricos con un F_0/X_0 bajo:

En diversos trabajos se emplea un valor bajo de este cociente, menor a 0.1 mg DQO/mg SSV (Brouwer y col, 1998; Mathieu y Etienne, 2000; Orhon y col., 2002; Orhon y Okutman, 2003). Estas condiciones favorecen una elevada concentración de biomasa y un contenido bajo de materia orgánica. En este tipo de ensayos, el valor de la OUR inicial es elevado debido a la presencia de materia orgánica. A medida que la misma se consume el valor de la OUR disminuye rápidamente. En estas condiciones el consumo de sustrato es muy rápido y no se produce un cambio importante en la concentración de biomasa durante el experimento. Sin embargo, el tiempo empleado por las bacterias para consumir el sustrato presente es muy pequeño lo que genera una gran dificultad para registrar en forma adecuada la variación de la OUR en este período.

2-Análisis respirométricos con un F_0/X_0 medio:

Algunos autores emplean un valor medio de F_0/X_0 para mejorar el muestreo de la OUR en el ensayo. Ekama y col., (1986) consideran que un valor de 0.6 mg DQO/mg SSV permite muestrear en forma adecuada el intervalo del experimento en el cual se consume S_s . Otros trabajos también han llevado a cabo análisis respirométricos implementando un valor de F_0/X_0 intermedio (Sözen y col., 1998; Çokgör y col., 1998; Nuhoglu y col., 2004).

3-Análisis respirométricos con un F_0/X_0 alto:

Este tipo de análisis se lleva a cabo con agua residual sin el agregado de fango endógeno. Es decir, las bacterias presentes en el agua residual son las responsables del consumo de oxígeno. En estas condiciones se favorece una elevada disponibilidad de sustrato con una concentración muy baja de microorganismos (Wentzel y col., 1999; Mathieu y Etienne, 2000; Vollertsen y Hvitved-Jacobsen, 2002). El cociente F_0/X_0 elevado conduce a un comportamiento muy diferente respecto a los análisis anteriores. Si bien el valor de la OUR inicial es muy bajo, se produce un aumento del mismo por el crecimiento de los microorganismos. En el momento que se consume toda la fracción S_s , los valores de la OUR describen una rápida disminución. Este tipo de análisis permite una determinación clara del momento en el cual se ha consumido todo el sustrato rápidamente biodegradable. Sin embargo, al favorecer el crecimiento de la biomasa cambian sustancialmente las condiciones del experimento.

Los diferentes valores de F_0/X_0 empleados en los análisis respirométricos conducen a condiciones experimentales muy diversas para el crecimiento bacteriano. Los microorganismos logran adaptarse a las condiciones externas activando mecanismos específicos de control.

La influencia del cociente F_0/X_0 en la determinación de la fracción S_s se ha estudiado en un rango muy estrecho de variación de este cociente (Çokgör y col., 1998). Sin embargo, se considera conveniente realizar una serie de

análisis respirométricos que permitan estudiar un rango más amplio de condiciones iniciales.

b. Fracción de materia orgánica lentamente biodegradable X_S

Orhon y Okutman, (2003) proponen determinar esta fracción a partir de datos experimentales de OUR de dos análisis respirométricos realizados con agua filtrada y agua residual total empleando un F_0/X_0 bajo. El análisis respirométrico que emplea agua residual total muestra valores de OUR más altos que los del análisis respirométrico del agua filtrada. Esta diferencia de OUR se debe a la materia orgánica lentamente biodegradable presente en el análisis del agua residual total. De esta manera la fracción X_S puede calcularse empleando la siguiente expresión:

$$X_S = \frac{1}{(1 - Y_H)} \left[\int_0^{t_{\text{final}}} \text{OUR}_{\text{influyente total}} dt - \int_0^{t_{\text{final}}} \text{OUR}_{\text{influyente filtrado 0.1}\mu} dt \right] \quad \text{Ec. 38}$$

1.8.3 Caracterización de los nutrientes

Los nutrientes son los materiales que los organismos utilizan para su crecimiento. Las especies químicas clasificadas como nutrientes se dividen en dos grupos:

- **Micronutrientes:** aquellos componentes que sólo son necesarios en cantidades a nivel de traza para formar parte de la materia celular (Cu, Fe, Zn, Co, B, Mo,...).
- **Macronutrientes:** especies químicas de las que son necesarias mayores cantidades para el crecimiento celular (C, N, P, Si, S, Na, Ca, K, Mg,...).

La ausencia de cualquiera de estos nutrientes significaría una inhibición en el crecimiento celular. En el medio ambiente se pueden encontrar nutrientes inorgánicos, es decir no asociados a ningún compuesto de carbono, o

nutrientes orgánicos, los cuales forman parte de estructuras orgánicas asociados a compuestos de carbono.

Puesto que en los procesos de depuración del agua residual se elimina nitrógeno y fósforo, a continuación se describen las diferentes formas bajo las cuales pueden estar presentes estos nutrientes en el agua residual. Cabe destacar que el nitrógeno se encuentra en gran proporción mientras que la concentración de fósforo es notablemente menor.

1.8.3.1 Nitrógeno

El contenido total en nitrógeno está compuesto por nitrógeno orgánico, amoníaco, nitrito y nitrato, como se indica en la Tabla 16. En el agua residual reciente, el nitrógeno se encuentra primariamente combinado en forma de materia proteínica y urea, aunque su paso a la forma amoniacal se produce enseguida. El nitrógeno en forma de nitrito es muy inestable y se oxida fácilmente a nitrato, raramente excede a 1 mg/l en el agua residual (Metcalf y Eddy, 1995). El nitrógeno como nitrato, es la especie más estable, dado que es el estado más oxidado.

Tabla 16: Formas predominantes del nitrógeno.

N _{total} (N _T)	N-Kjeldahl	N _{org}	Suspendido (N _T SUSP)
		NH ₄ ⁺ (S _{NH4})	Soluble (N _T SOL)
	N-nítrico (S _{NO3})	NO ₂ ⁻	
		NO ₃ ⁻ (S _{NO3})	

Las analíticas empleadas en la presente tesis para la determinación de todas las fracciones del nitrógeno son las detalladas en el Standard Methods, (2005).

1.8.3.2 Fósforo

Las formas más frecuentes en las que se presenta el fósforo en soluciones acuosas incluyen: ortofosfato, polifosfato y fósforo orgánico como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 17: Formas predominantes del fósforo.

P _{total} (P _T)	Porgánico	Suspendido (P _{T SUSP})
	Polifosfatos (X _{PP})	Soluble (P _{T SOL})
	Ortofosfatos (S _{PO4})	

La concentración de fósforo en aguas residuales municipales puede variar entre 4 y 15 mg P/l (Metcalf y Eddy, 1995). En este trabajo se han empleado las analíticas descritas en el Standard Methods, (2005) para la determinación de todas las fracciones del fósforo.

1.9 MEDICIÓN DE X_{PHA}

El polímero polihidroxiclcanoato, X_{PHA}, tiene una participación fundamental en el proceso de eliminación biológica de fósforo (ver apartado 1.4.3). Las bacterias PAO, principales responsables de la eliminación de fósforo, consumen AGV para generar en condiciones anaerobias el polímero intracelular X_{PHA}. Otro grupo de bacterias, las GAO, son capaces de competir con las bacterias PAO por los AGV y generar también dicho polímero aunque no participan en el proceso de acumulación de fósforo. Por esta razón, existe creciente interés en lograr una medición adecuada de dicho polímero y principalmente incluirlo en los procedimientos de calibración de los parámetros característicos del proceso.

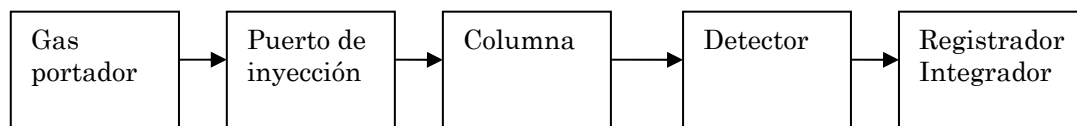
Aunque la composición de los AGV en el agua residual puede variar, estos compuestos se encuentran principalmente como ácido acético o propiónico. Las bacterias PAO producen principalmente poli- β -hidroxibutirato (PHB) cuando la fuente principal de AGV es ácido acético (Smolders y col., 1994; Pijuan y col., 2004) y poli- β -hidroxivalerato (PHV) y poli- β -hidroxi-2-metilvalerato (PH2MV) cuando la fuente principal es ácido propiónico (Oehmen y col., 2005a). Las bacterias GAO convierten el ácido acético a PHB y PHV (Filipe y col., 2001a), mientras que PHV y PH2MV son las fracciones principales de X_{PHA} producidas cuando consumen ácido propiónico (Oehmen y col., 2005a). Dada la importancia de los poli- β -hidroxialcanoatos en el metabolismo de las bacterias PAO y GAO se ha dedicado un gran esfuerzo experimental para determinar la concentración del polímero X_{PHA} .

La Cromatografía Gaseosa (GC) es el método más empleado en la cuantificación de X_{PHA} en sistemas de eliminación biológica de fósforo. A continuación se expone brevemente en qué consiste este método analítico.

1.9.1 Generalidades de la Cromatografía Gaseosa

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija y otra móvil. En cromatografía gaseosa, la fase móvil es un gas que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Esta fase fija puede ser un sólido poroso (cromatografía gas-sólido o CGS), o bien una película líquida delgada que recubre un sólido particulado o las paredes de la columna (cromatografía gas-líquido o CGL). En el primer caso, el proceso que produce la separación es la adsorción de los componentes de la mezcla sobre la superficie sólida y en el segundo, la partición de los mismos entre las fases líquida y gaseosa.

Un instrumento para cromatografía gaseosa puede representarse por el siguiente esquema:



El gas portador (fase móvil) proviene de cilindros provistos con válvulas reductoras de presión. La muestra se introduce en el inyector con una microjeringa a través de un *septum* de goma. Allí se produce la vaporización instantánea de la misma y su introducción en la corriente de gas. La columna se halla dentro de un horno de temperatura variable, lugar donde se realiza la separación de los componentes de la muestra. El detector produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia a medida que cada componente separado fluye a través de él. Esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo. Idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador (o el software de control) calcula además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de analito.

Normalmente suele realizarse una calibración por estándar externo o utilizando un estándar interno. A continuación se realiza una breve descripción de ambas:

Estándar externo: Se preparan muestras de patrones de concentración conocida que se analizan y permiten construir una curva de calibración para cada componente a cuantificar. Con este método es necesario medir exactamente los volúmenes inyectados tanto de los patrones como de la muestra incógnita.

Estándar interno: Se agrega a la muestra una cantidad conocida de un compuesto que no está presente originalmente. En este caso, la calibración se realiza analizando patrones de concentración conocida para cada componente a cuantificar a los cuales se les agrega la misma cantidad del estándar interno que a la muestra incógnita. La curva de calibración se

construye graficando el cociente entre la señal del compuesto incógnita y el estándar interno en función de la concentración del analito incógnita. Este método elimina el error cometido por la falta de reproducibilidad en el volumen inyectado.

1.9.2 Condiciones de trabajo

El método de extracción de X_{PHA} originalmente propuesto por Braunegg y col., 1978, y Comeau y col., 1988, se basa en la hidrólisis del polímero y la posterior conversión del monómero 3-hidroxialcanoato a un metil ester. Para lograr esta etapa de hidrólisis se somete la muestra a una digestión a 100°C en presencia de un alcohol acidificado y un solvente. Luego del período de digestión se adiciona agua para provocar la separación de fases: una fase acuosa y una orgánica. En esta última se concentra el metil ester del monómero 3-hidroxialcanoato, siendo ésta la fase que se filtra y se analiza por CG.

El método mencionado en el párrafo anterior ha sido empleado en numerosos trabajos. Sin embargo, las condiciones experimentales y cromatográficas no siempre son las mismas. Es posible observar cambios en el empleo de: 1) la solución acidificada, 2) el solvente, 3) el estándar interno, 4) el tiempo de digestión de las muestras, 5) la temperatura del inyector, 6) la temperatura del detector, y 7) la curva de temperatura del método cromatográfico. Con el propósito de observar las diferentes variantes a la metodología originalmente propuesta por Braunegg y col., 1978, y Comeau y col., 1988, en la Tabla 18 se presentan las distintas condiciones experimentales empleadas. En primer lugar se muestra el método de Comeau y col., 1988.

La Tabla 18 muestra una gran variedad de condiciones de extracción del polímero. Se observa que la solución de alcohol acidificado es en general metanol acidificado con ácido sulfúrico entre el 3% y el 20%. Sin embargo, 1-

propanol con hidroxilclorídrico al 20% también ha sido empleado para lograr la hidrólisis y posterior formación del ester. El tiempo de digestión varía entre 2 y 20 horas, aunque en general se emplean tiempos pequeños. El ácido benzoico cumple la función de estándar interno y el cloroformo se emplea habitualmente como solvente. En relación a las condiciones cromatográficas sí es posible notar una mayor variedad en el programa de temperatura empleado en el horno del cromatógrafo.

Tabla 18: Método de determinación de X_{PHA} por GC. Diferencias en las condiciones experimentales empleadas.

Referencia	Solución acidificada	Solvente	Tiempo de digestión	Estándar Interno	T del Inyector	T del Detector	Rampa de temperatura
Comeau y col., 1988	metanol con H ₂ SO ₄ 3%	Cloroformo	3.5 h	Ac. Benzoico	210°C	220°C	50°C (1min); 8°C/min; 160°C (5min)
Brandl y col., 1988	metanol con H ₂ SO ₄ 15%	Cloroformo	2.5 h	~	230°C	275°C	80°C (4min); 8°C/min; 160°C (6min)
Smolder y col., 1994 Brdjanovic y col., 1999	1-propanol con hidroxilclorídrico 20%	Dicloroetano	2 h	Ac. Benzoico	200°C	240°C	~
Satoh y col., 1994	metanol con H ₂ SO ₄ 20%	Cloroformo	7 h	Ac. Benzoico	230°C	250°C	80°C (4min); 8°C/min hasta 120°C; 30°C/min hasta 200°C
Zeng y col., 2003	metanol con H ₂ SO ₄ 3%	Cloroformo	6 h	~	100°C	240°C	100°C (1min); 10°C/min hasta 150°C; 45°C/min hasta 270°C
Chen y col., 2004	metanol con H ₂ SO ₄ 20%	Cloroformo	20 h	Ac. Benzoico	230°C	230°C	100°C (2min); 20°C/min 160°C (2 min)
Lemos y col., 2006	metanol con H ₂ SO ₄ 20%	Cloroformo	3.5 h	Heptadecano	250°C	250°C	40°C (1min); 3°C/min 220°C (10 min)

En los trabajos de la Tabla 18 se mide el contenido de PHB y PHV, aunque se considera también necesaria la determinación de PH₂MV. Oehmen y col., (2005b) avanzaron en el estudio del método de determinación de X_{PHA}. Para esto implementaron dicho método a diferentes concentraciones del ácido sulfúrico en metanol y distintos tiempos de digestión. En relación a la determinación de PHB y PHV establecieron que una solución de metanol acidificada al 3% con ácido sulfúrico permite una óptima recuperación de estos polímeros. Concentraciones superiores de ácido producen señales

dobles en el cromatograma. Por el contrario una concentración inferior conduce a una hidrólisis parcial del polímero. En relación al tiempo de digestión no hallaron una gran variabilidad en la recuperación de PHB para un tiempo de digestión entre 2 y 20 h. En cambio, la condición óptima de extracción de PH2MV se logra con una solución de metanol acidificada al 10% con ácido sulfúrico y un tiempo de digestión de 20 h.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de investigación es la optimización de la metodología que debe emplearse para lograr una adecuada simulación del funcionamiento de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR). Para el logro de dicho objetivo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1- Desarrollo de una metodología de caracterización del agua residual tras la valoración de diferentes métodos publicados en la bibliografía.
- 2- Mejora del procedimiento de calibración *off-line* del modelo BNRM1 empleado actualmente, basado en la metodología propuesta por Peña-Roja y col., (2002).
- 3- Combinación del método de calibración *off-line* de los parámetros del modelo, con la metodología de calibración dinámica. De esta manera sería posible un aprovechamiento sustancial de las ventajas de ambos procedimientos para lograr identificar los parámetros de elevada influencia del modelo BNRM1.

Para alcanzar los objetivos específicos expuestos se proponen las siguientes actividades:

- 1- Operación y seguimiento de la planta piloto que el grupo de investigación CALAGUA tiene en la EDAR ubicada en el Barranco del Carraixet. Se operará esta planta en diferentes edades de fango que permitan una adecuada eliminación de materia orgánica y nutrientes.
- 2- Estudio comparativo de los distintos procedimientos de caracterización del agua residual propuestos en la bibliografía. Para lo cual serán desarrolladas las siguientes tareas:
 - a- Valoración de la influencia del tamaño de filtro en el fraccionamiento del agua residual.
 - b- Estudio de la influencia del cociente F_0/X_0 en el análisis respirométrico para la determinación de la fracción S_s del agua

- residual.
- c- Comparación de las fracciones S_S y X_S obtenidas por medio del método respirométrico y físico-químico.
- 3- Para mejorar el procedimiento de calibración *off-line* se realizarán las siguientes tareas:
- a- Puesta a punto de la técnica de medición del polímero X_{PHA} por cromatografía gaseosa para determinar la evolución de este compuesto en el experimento *off-line* de las bacterias PAO en condiciones aerobias. En la función objetivo a minimizar del algoritmo de calibración se considerará también la concentración de X_{PHA} .
 - b- Calibración del modelo BNRM1 mediante experimentos *off-line*, en diferentes edades de fango de la planta piloto. Se incorporará la determinación de X_{PHA} en el procedimiento de calibración de las bacterias PAO en condiciones aerobias.
 - c- Estudio de la calidad de los datos experimentales mediante el análisis de la sensibilidad de los ensayos de calibración *off-line*.
- 4- Las tareas a desarrollar para combinar el método de calibración *off-line* con el dinámico se mencionan a continuación:
- a- Calibración de los parámetros del modelo biológico por medio de los ensayos *off-line*.
 - b- Simulación del comportamiento en estado estacionario de la planta piloto mediante el programa de simulación DESASS con los parámetros calibrados en el punto a.
 - c- Análisis de sensibilidad en estado estacionario para determinar el conjunto de parámetros potencialmente identificables a partir de los datos experimentales disponibles, considerando como estado no perturbado la simulación de la planta piloto del punto b.
 - d- Campaña de muestreo exhaustiva para adquirir datos dinámicos del influente y del efluente de la planta piloto.
 - e- Simulación de la planta piloto en condiciones dinámicas para lo cual se consideran los datos del punto d.

- f- Calibración de parámetros no determinados en los experimentos *off-line*, seleccionados de acuerdo al análisis de sensibilidad del punto c. El ajuste de estos parámetros permite minimizar el error entre los datos dinámicos predichos por el modelo y los experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PLANTA PILOTO

La planta piloto en la que se ha desarrollado el trabajo experimental de la presente tesis se encuentra ubicada en la EDAR del Barranco del Carraixet (Alboraia, Valencia). El trabajo experimental propuesto ha sido desarrollado empleando dos esquemas experimentales diferentes, los cuales se describen a continuación.

3.1.1 Esquema de operación 1

La planta piloto ha sido diseñada para el estudio del proceso de fangos activados. Esta planta se compone de un decantador primario, un reactor biológico y un clarificador secundario. Para este trabajo de tesis, el decantador primario se ha empleado como depósito de homogeneización del agua influente, debido a que este caudal proviene de una planta piloto de fermentación y elutriación de fango primario en la cual se realiza un proceso de decantación primaria. En esta fase experimental el influente que entra a la planta de fermentación se toma de la salida del desarenador de la EDAR del Carraixet.

Con la finalidad de conseguir la eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes, se ha empleado un esquema UCT (University of Capetown) (ver apartado 1.5.1). El reactor biológico se encuentra dividido en tres zonas, en cada una de las cuales se trabaja en condiciones distintas. En la primera zona se desarrollan condiciones anaerobias, en la segunda anóxicas y en la última aerobias. Este esquema de tratamiento realiza la recirculación de fangos proveniente del decantador secundario al reactor anóxico. De esta manera se reduce la presencia de nitratos en la zona anaerobia, optimizando el proceso de eliminación biológica de fósforo. La recirculación de nitratos, es

decir la recirculación del reactor aerobio al anóxico, se debe controlar de tal manera que no entren más nitratos al reactor anóxico de los que se pueden consumir en esta etapa y por lo tanto la concentración de nitratos en la recirculación del reactor anóxico al anaerobio sea prácticamente nula. Cada una de las recirculaciones es realizada por medio de bombas de membrana.

El tiempo de retención celular (o edad de fango) se establece mediante la purga de fangos del sistema. En el esquema de operación 1 la purga se realiza en el reactor aerobio para conocer de manera más fiable el contenido de sólidos que se extraen del sistema. La purga de fangos se lleva a cabo mediante una bomba peristáltica, la cual está controlada por ordenador y se conecta de forma automática. En la Figura 14 se muestra el esquema de operación 1 y en la Tabla 19 se detallan los datos de caudales y volúmenes empleados en la planta piloto. En la Figura 15 se muestra la planta piloto operada según el esquema 1.

El reactor biológico está formado por un único tanque de acero inoxidable dividido en tres zonas: anaerobia, anóxica y aerobia. La separación entre estas zonas se realiza mediante placas que se ajustan a las paredes del tanque. El paso del licor mezcla de una zona a otra se realiza a través de unos orificios situados en las placas de tal manera que no se produzca ningún flujo preferencial.

El mecanismo de agitación de la planta piloto está formado por una serie de agitadores mecánicos de velocidad regulable. El número de agitadores colocados en cada zona es el necesario para lograr un régimen de mezcla completa. La velocidad y el sentido de giro de los agitadores de las zonas anaerobia y anóxica es el necesario para minimizar la transferencia de oxígeno desde la atmósfera al licor mezcla.

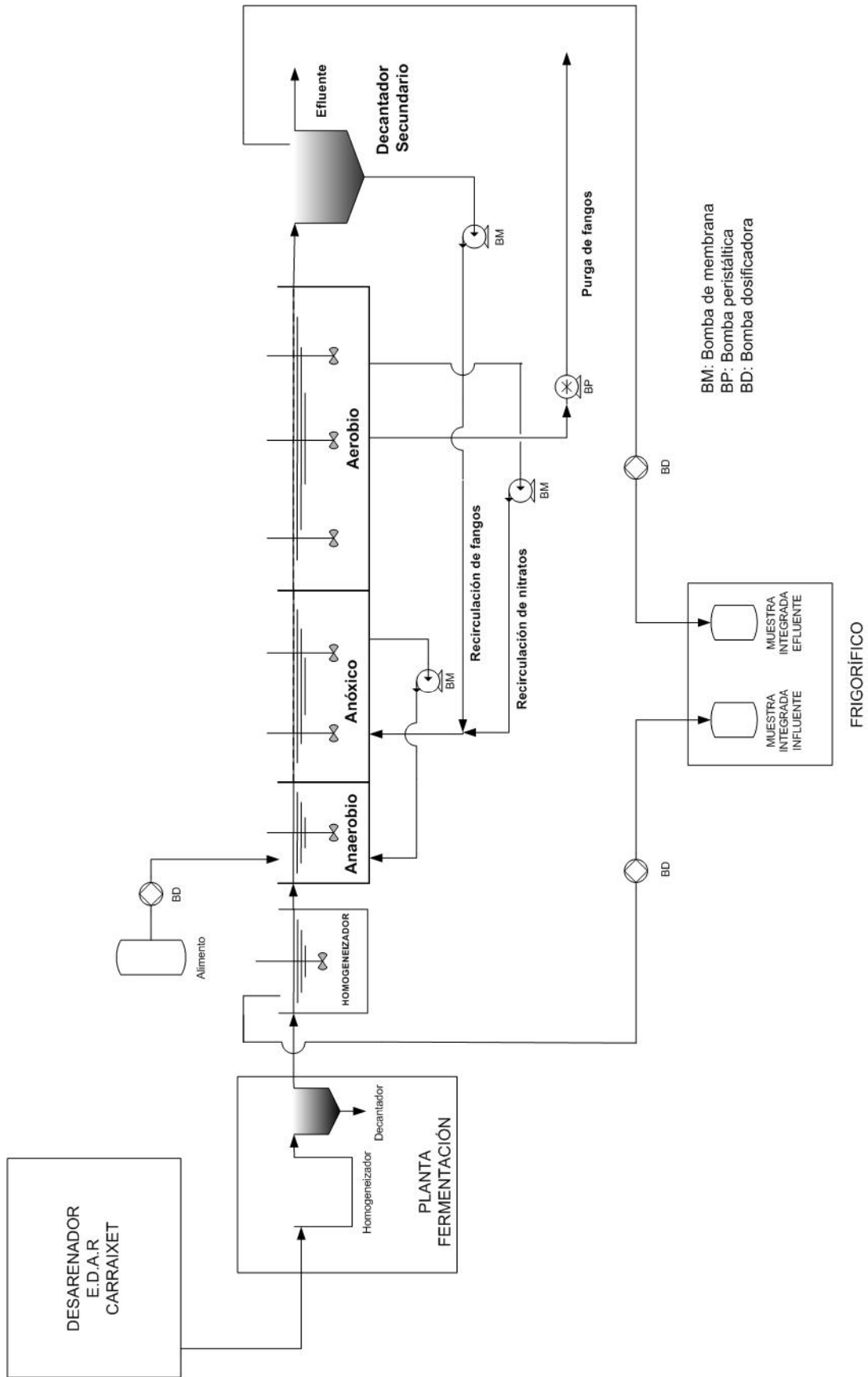


Figura 14: Planta piloto. Esquema de operación 1.

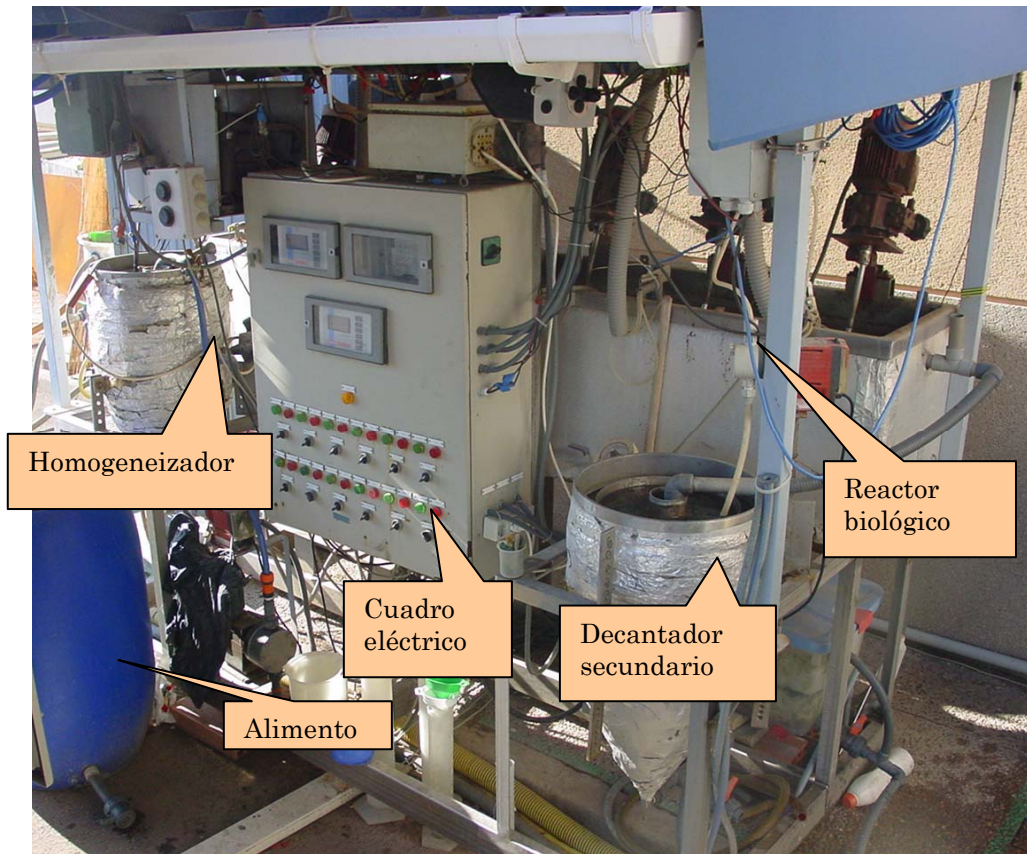


Figura 15: Planta piloto operada según el esquema 1.

En el reactor aerobio se cuenta con un sistema de control del oxígeno disuelto (OD). Se dispone de una sonda de OD (EVITA[®]OXY 4150, DANFOSS) cuya señal es registrada por un programa de adquisición de datos a través del PLC (controlador lógico programable). El valor consigna de concentración de OD en la zona aerobia se ha fijado en 2 mg O₂/l de manera que el sistema de control actúa sobre un variador de frecuencia (T-VERTER, Serie E2) que regula el caudal de aire suministrado por una soplante (Siemens Gardner Denver Elmo Tech, Serie G_200, Tipo 2BH1300).

Además, se dispone de un sistema de control de la temperatura del reactor biológico. El registro se realiza a través de la sonda de OD, la cual mide también la temperatura del reactor aerobio. A partir de un valor consigna fijado en T=20°C se actúa sobre una resistencia (220V, 1500W) o un serpentín de refrigeración (EUROKLIMAT, Serie IP, Modelo M10), ambos ubicados en el homogeneizador. Este sistema de control permite mantener la

temperatura de todo el reactor biológico en el valor establecido. Cabe destacar que la planta piloto está cubierta externamente con una capa de aislante térmico para minimizar el intercambio de calor con el ambiente.

La concentración de nitratos del reactor aerobio se registra continuamente a través de una sonda (EVITA[®] INSITU 5100, DANFOSS). La señal se recoge a través del PLC en el ordenador de la planta piloto. El pH, potencial redox y conductividad se registra en diferentes reactores de la planta para lograr un mejor seguimiento del proceso. La información suministrada por estas sondas se obtiene mediante un dispositivo de la marca CONSORT. La información se digitaliza en formato RS-485 que es adquirida por el ordenador mediante la correspondiente tarjeta electrónica.

El montaje experimental dispone de un sistema de muestreo tanto para el influente como para el efluente de la planta piloto. Una bomba dosificadora recoge agua residual del depósito de homogeneización y otra del sobrenadante del decantador secundario. El caudal de las bombas es constante para lograr una muestra integrada de 24 horas. Las muestras se almacenan en un frigorífico, asegurando de esta manera que conserven sus características.

Para asegurar una población de bacterias acumuladoras de polifosfatos se adiciona ácido acético al reactor anaerobio. La concentración de ácidos grasos volátiles provenientes de la planta piloto de fermentación presenta oscilaciones que podrían afectar al desarrollo de estas bacterias. Esta adición se realiza mediante una bomba de desplazamiento positivo. Esta disolución de ácido acético también contiene fósforo para evitar que este nutriente se convierta en factor limitante en el crecimiento de la biomasa y para potenciar la actividad de las bacterias PAO. La concentración de la solución se calcula para lograr una alimentación aproximada de 80 mg DQO/l de ácido acético y 8 mg P/l de fósforo.

3.1.2 Esquema de operación 2

Para lograr un comportamiento más estable de la planta piloto, con un diagrama que permita un esquema ágil y con posibilidades de variar las condiciones de funcionamiento de cada reactor, se llevó a cabo una modificación al diagrama experimental detallado en el apartado anterior. Cabe destacar que la planta piloto continua operando con el esquema UCT dado que este permite una eliminación adecuada de materia orgánica y nutrientes.

La modificación ha consistido en: 1) un incremento de la capacidad volumétrica de la planta permitiendo aumentar aproximadamente al doble el caudal de alimentación a la misma y 2) el aumento del número reactores, con la finalidad de lograr una mejora de la eficiencia de operación de toda la planta. En la Figura 16 se muestra el esquema de operación 2 y en la Tabla 19 se detallan las características del mismo. Es posible observar que los dos diagramas poseen el mismo TRH. Así también se ha empleado el mismo decantador secundario, puesto que se considera que su diseño es apropiado para los dos esquemas. La zona anaerobia y anóxica consiste en un tanque dividido en cinco secciones de las cuales las dos primeras funcionan en condiciones anaerobias y las tres últimas de forma anóxica. La zona aerobia consiste en un tanque sin divisiones internas. Esta zona recibe el licor mezcla proveniente de la etapa anóxica mediante una conducción externa.

El influente de la planta piloto se toma de la arqueta de salida del decantador primario de la EDAR del Carraixet, con lo cual el agua residual ya ha pasado por una etapa de decantación. De esta manera el influente entra directamente a un homogeneizador y posteriormente a la planta piloto.

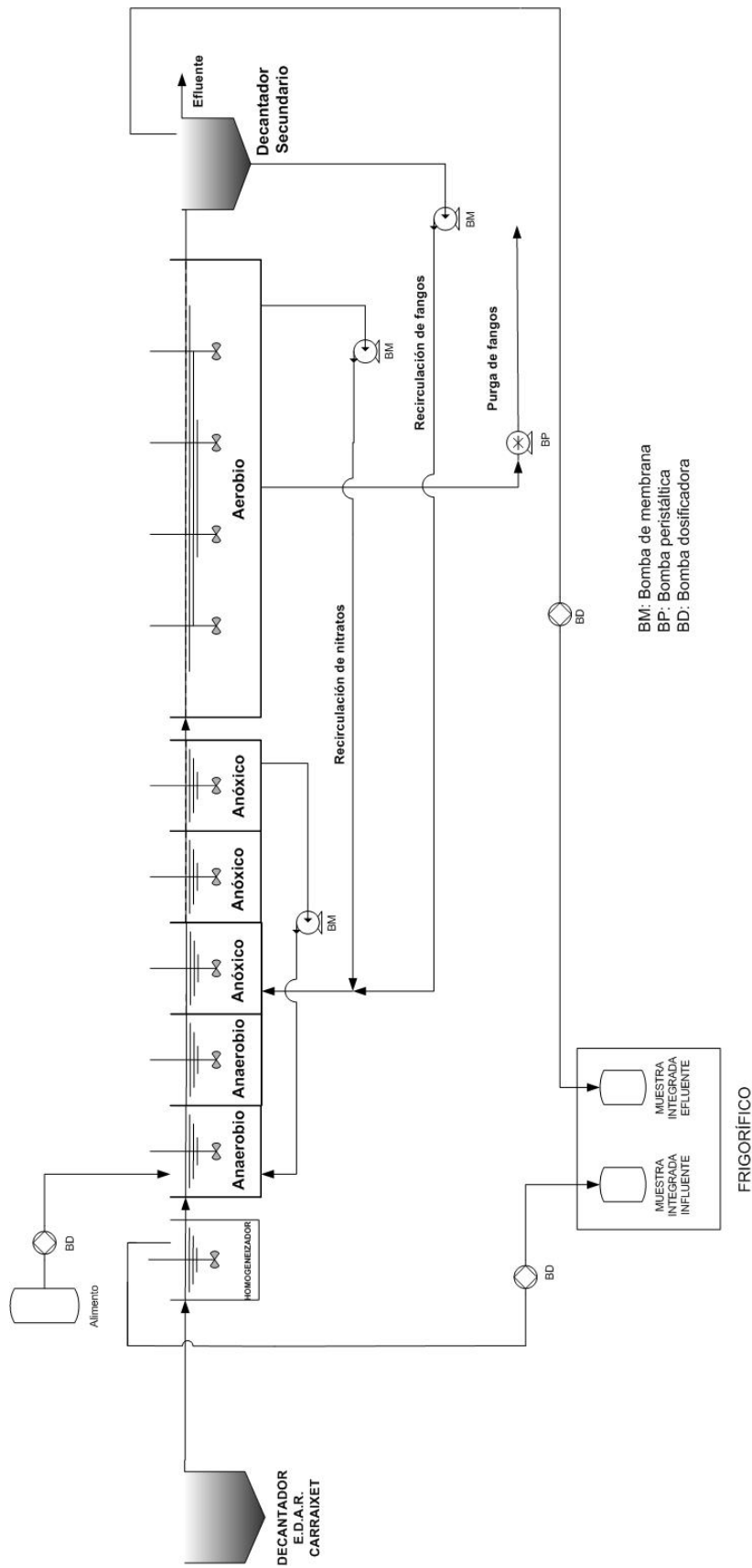


Figura 16: Planta Piloto. Esquema de operación 2.

En la Figura 17 se muestra la planta piloto operada con el esquema 2.

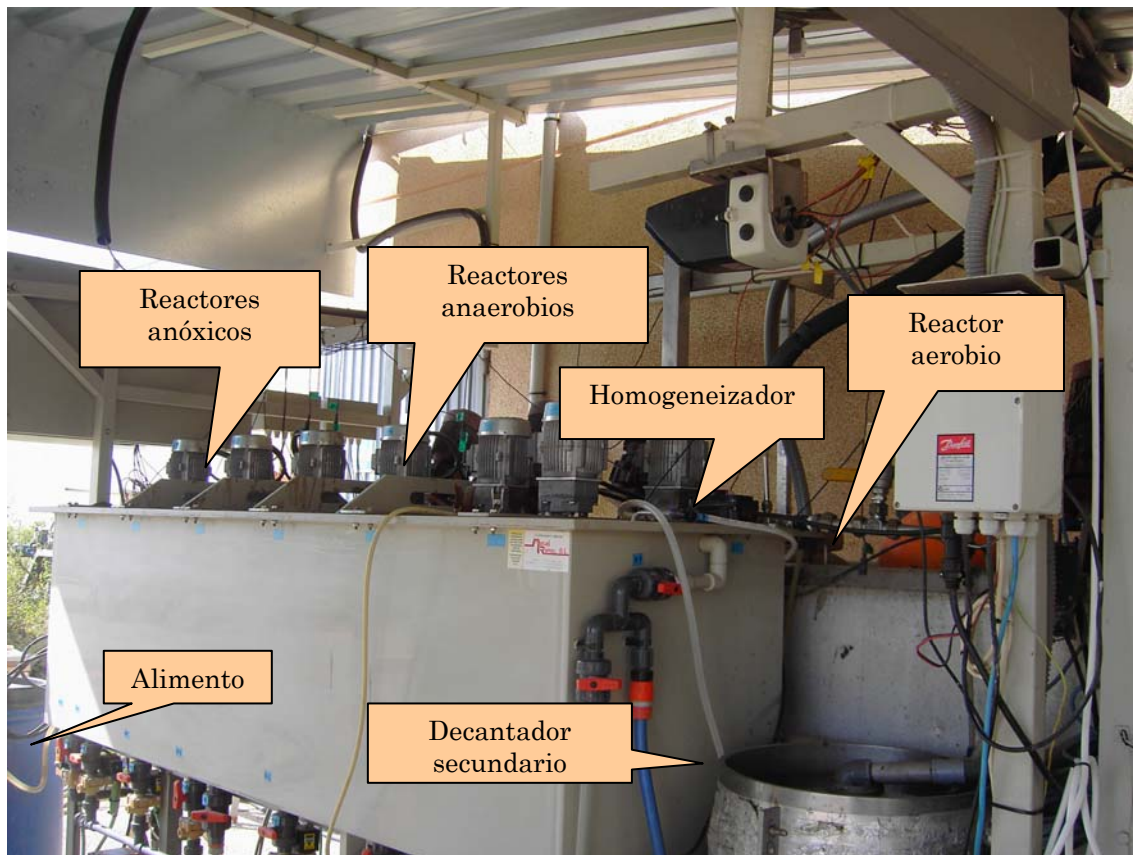


Figura 17: Planta piloto operada según el esquema 2.

Tabla 19: Caudales empleados y datos de diseño de los esquemas de operación 1 y 2.

	Esquema 1	Esquema 2
$Q_{ENTRADA}$	40 l/h	84 l/h
Q_{AX-AN} (recirculación del último anóxico al primer anaerobio)	80 l/h	192 l/h
Q_{SEC-AX} (recirculación del dec. secundario al primer anóxico)	49 l/h	103 l/h
Q_{AER-AX} (recirculación del aerobio al primer anóxico)	53 l/h	111 l/h
$Q_{ALIMENTO}$	0.26 l/h	0.54 l/h
V_{TOTAL}	384 l	813 l
$V_{ANAEROBIO}$	64 l	172 l
$V_{ANÓXICO}$	128 l	257 l
$V_{AEROBIO}$	192 l	384 l
$V_{DECANTADOR}$	80 l	80 l
Geometría Dec.	Circular	Circular
TRH	9.6 h	9.6 h

El esquema de operación 2 también cuenta con un sistema de seguimiento mediante sondas que permiten realizar un análisis continuo del comportamiento de la planta, así como el control de temperatura y oxígeno

detallado en el apartado anterior. La toma de muestras se realiza de la misma manera que el esquema anterior, y también se adiciona ácido acético y fósforo empleando similares concentraciones a las del esquema de operación 1.

3.1.3 Operación y seguimiento de la planta piloto

En primer lugar, se fija el tiempo de retención celular en uno de los valores propuestos de acuerdo a los objetivos del trabajo de investigación. El siguiente paso es dejar evolucionar el sistema hasta que alcance el estado estacionario. Durante esta fase, se realiza un seguimiento de algunas de las variables del sistema para controlar su correcto funcionamiento. En la Tabla 20 se describen las analíticas que se realizan en esta fase del trabajo y su frecuencia. Una vez alcanzado el estado estacionario, se realiza un seguimiento analítico exhaustivo, más completo que el anterior, para determinar el estado del sistema en las condiciones de operación establecidas. En estos análisis exhaustivos se realizan las analíticas detalladas en la Tabla 20 y las incluidas en la Tabla 21. La información obtenida en los mismos permite comparar los resultados de la simulación con los obtenidos experimentalmente en la caracterización del estado estacionario.

Tabla 20: Analíticas de seguimiento de la planta piloto.

<i>Analíticas</i>	<i>Frecuencia</i>
Sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV) del influente, reactores y efluente.	2 veces por semana
Fósforo soluble (SP_{O_4}) del influente, reactores, efluente y alimento.	2 veces por semana
Amonio (SNH_4) del influente, reactores y efluente.	2 veces por semana
Nitratos (SN_{O_3}) del influente, reactores y efluente.	2 veces por semana
Ácidos grasos volátiles (AGV) del influente, reactor anaerobio y alimento.	2 veces por semana
Índice volumétrico de fango (IVF)	1 vez por semana

Tabla 21: Analíticas exhaustivas de la planta piloto.*Analíticas*

Demanda química de oxígeno (DQO) total del influente, reactores y efluente.

DQO soluble del influente y efluente.

Demanda biológica de oxígeno límite (DBO_L) total y soluble del influente y efluente.

Fósforo total (P_T) del influente, reactores y efluente.

Nitrógeno total (N_T) del influente y efluente.

Nitrógeno total soluble (N_{T SOL}) del influente, reactores y efluente.

Mediante la metodología diseñada por Peña-roja y col., (2002) para las bacterias heterótrofas, PAO y autótrofas se determinan los parámetros del modelo BNRM1. Por último, se repite el trabajo experimental manteniendo el tiempo de retención celular de la planta en otro valor propuesto.

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL

Uno de los objetivos propuestos es estudiar los distintos métodos de caracterización del agua residual, en particular los que permiten cuantificar las fracciones de materia orgánica. Como se ha comentado en la Introducción, en la bibliografía se han publicado numerosas propuestas de caracterización del agua residual, las cuales pueden agruparse de la siguiente forma: 1) caracterización físico-química, basada en un fraccionamiento del agua residual mediante filtración, y 2) caracterización biológica a través del análisis respirométrico. Debido a la falta de estudios que permitan comparar estos métodos se ha propuesto un análisis experimental exhaustivo con la finalidad de estudiar los siguientes aspectos:

- Influencia del tamaño de filtro en el fraccionamiento del agua residual. Para esto se analizará la biodegradabilidad de las fracciones solubles obtenidas con dos tamaños de filtros: 0.1 y 0.45 μm empleando el método respirométrico.

- Influencia de la relación F_0/X_0 en el análisis respirométrico para la determinación de la fracción S_s .
- Análisis comparativo de las fracciones S_s y X_s obtenidas mediante los métodos físico-químico y respirométrico.
- Influencia de la calidad del agua en el procedimiento de caracterización.

A continuación se detalla la metodología y el equipamiento experimental empleado.

3.2.1 Método Físico-químico

El método físico-químico es el propuesto por Peña-Roja y col., (2002). La fracción S_I se obtiene con la Ec. 25, la S_s por medio de la Ec. 29 y las componentes particuladas X_I y X_s se pueden calcular con la Ec. 30 y la Ec. 32, respectivamente.

3.2.2 Método Respirométrico

El análisis respirométrico permite valorar el contenido de materia orgánica biodegradable presente en el agua residual. A continuación se detalla el equipo experimental empleado y los diferentes análisis realizados.

3.2.2.1 Respirómetro

En la Figura 18 se presenta el dispositivo experimental empleado para llevar a cabo los análisis respirométricos. Este equipo consta de un recipiente cilíndrico de 20 cm de diámetro y 36 cm de alto. En cada análisis, el volumen de líquido es de 7 l el cual se mantiene continuamente agitado. El agitador empleado es de la marca comercial Heidolph el cual permite trabajar en el intervalo de 45 a 2000 rpm. La paleta conectada a este agitador es rectangular de 5.5 cm de ancho y 6.5 cm de longitud. El reactor

se encuentra en una cámara térmica que permite mantener la temperatura constante a 20°C. En cada experimento se agrega tiourea en una concentración de 20 mg/l, para inhibir el proceso de nitrificación.

El dispositivo experimental de la Figura 18 permite determinar la OUR del líquido mezcla en estudio. El oxígeno disuelto (OD) y la temperatura se registran por medio de la sonda del oxímetro WTW Oxi340. Un programa de ordenador, específicamente diseñado para esta tarea, registra el dato de OD y temperatura cada 5 segundos. En función del contenido de OD del fango se actúa sobre el aireador mediante el apagado o encendido del mismo por medio de un módulo de control a través del puerto paralelo. Este programa de ordenador permite operar de forma cíclica de la siguiente forma: i) se inicia la aireación hasta que la concentración de OD alcance el valor de 4 mg O₂/l, ii) en este momento se desconecta el aireador provocando una disminución del OD que es consumido por las bacterias, iii) cuando el valor de OD se encuentra en 2 mg O₂/l se inicia la aireación y comienza un nuevo ciclo. Los datos de OD obtenidos en la etapa en la cual no se airea el reactor se emplean para el cálculo de la OUR.

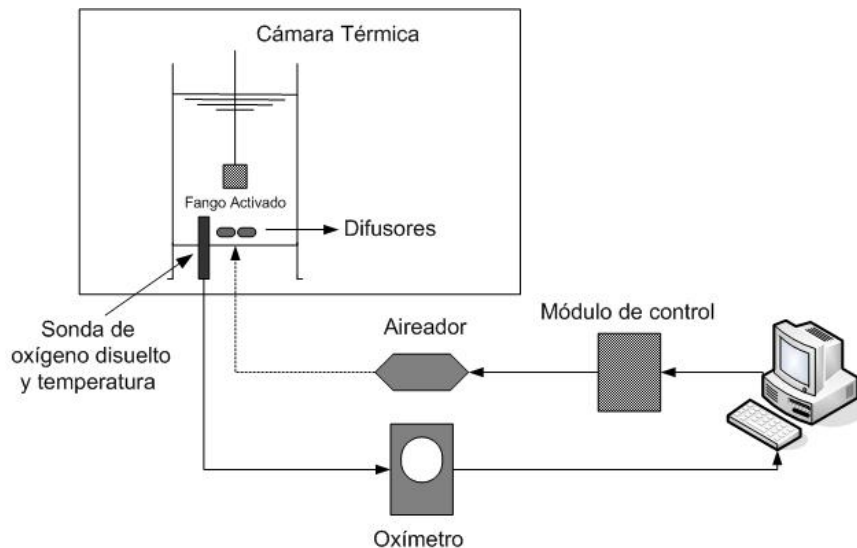


Figura 18: Esquema experimental del respirómetro.

El fango empleado en el análisis respirométrico debe encontrarse en estado endógeno. En estas condiciones todo el alimento ha sido consumido y cesa el crecimiento. Los organismos que aún permanecen viables utilizan la

materia orgánica de las células muertas como única fuente de alimento. Para alcanzar este estado se coloca fango activado en el dispositivo experimental de la Figura 18 y se airea hasta que la OUR presente un valor prácticamente constante.

3.2.2.2 *Análisis respirométricos*

En la Tabla 22 se describen los análisis respirométricos propuestos para alcanzar los objetivos relacionados a la caracterización del agua residual:

Tabla 22: Análisis respirométricos

Análisis respirométrico	Agua residual empleada	F_0/X_0	Intervalo de variación de F_0/X_0
A	Filtrada con 0.45 μm	Bajo	0.01 - 0.03 mgDQO/mgSSV
B	Filtrada con 0.1 μm	Bajo	0.01 - 0.06 mgDQO/mgSSV
C	Sin Filtrar	Bajo	0.07 - 0.25 mgDQO/mgSSV
D	Sin Filtrar	Medio	0.4 - 1.0 mgDQO/mgSSV
E	Sin Filtrar	Alto	> 1.5 mgDQO/mgSSV

En los análisis A, B, C y D se emplea fango en condiciones endógenas y agua residual en las proporciones adecuadas para lograr un cociente inicial F_0/X_0 en el valor deseado. En estos cuatro análisis se debe considerar el factor de dilución correspondiente. En el experimento E se emplea una relación inicial F_0/X_0 superior a 1.5 mgDQO/mgSSV. Para lograr este valor se utiliza únicamente agua residual sin filtrar, es decir sin agregar fango endógeno. En este caso los microorganismos presentes en el agua residual son los responsables del consumo de oxígeno.

Dado que interesa estudiar si la calidad del agua influye en los resultados, se ha propuesto analizar el agua residual que alimenta la planta piloto ubicada en la EDAR del Carraixet y el agua residual que alimenta las EDAR de Abarán y Pinedo, España.

Se ha propuesto realizar una serie de análisis en distintas fechas, para lo cual se toma fango activado proveniente de la zona aerobia del reactor biológico, y muestras integradas del influente y efluente de la planta. La

muestra integrada es representativa de lo que ha entrado o salido de la planta durante 24 h, puesto que se compone de pequeñas alícuotas tomadas durante este período de tiempo.

3.2.3 Diseño experimental de filtración

Un aspecto fundamental del estudio propuesto es el análisis de la influencia del tamaño de filtro en el fraccionamiento del agua residual. Para lo cual se analiza el agua residual filtrada con dos tamaños de filtro: 0.1 y 0.45 μm .

El agua residual filtrada con un tamaño de filtro de 0.45 μm se obtiene con filtros GEWater&Process Technologies (E04WP04700) de celulosa y un dispositivo de filtración con bomba de vacío. Se considera que éste es un sistema sencillo que permite una velocidad de filtración adecuada.

En la filtración del agua residual con un tamaño de poro de 0.1 μm se emplea una biomembrana. La unidad de filtración es Zee Weed-1, Zenon Environmental Systems Inc. Éste es un dispositivo delicado que puede obturarse con facilidad. Por esta razón se ha optado por emplear una bomba peristáltica conectada a un temporizador cíclico asimétrico para invertir el sentido de filtración. Esto permite trabajar en forma cíclica de la siguiente manera: durante 120 segundos se recoge permeado y en los siguientes 20 segundos se invierte el sentido de giro de la bomba para realizar un contralavado. Esta modalidad de trabajo permite emplear la biomembrana durante un tiempo mayor. Los recipientes que contienen el agua residual sin filtrar y filtrada se colocan en nevera a 4 °C para evitar una posible alteración de la calidad del agua. En la Figura 19 se muestra el dispositivo experimental que se emplea en esta etapa.

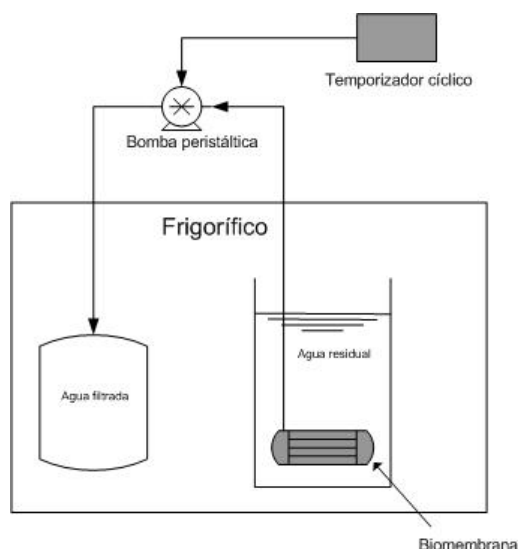


Figura 19: Dispositivo de filtración con biomembrana.

3.3 MEDICIÓN DE X_{PHA}

Uno de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación es mejorar el proceso de calibración mediante la determinación de la concentración del polímero X_{PHA} en los ensayos de calibración de las bacterias PAO en condiciones aerobias. Para la cuantificación del polímero se aplica la técnica propuesta por Comeau y col., (1988) con mínimas modificaciones. En este trabajo el fango se alimenta principalmente con ácido acético con lo cual se espera una mayor proporción de PHB y una menor proporción de PHV. Por esta razón se realiza la extracción con metanol acidificado con ácido sulfúrico al 3%, concentración sugerida por Oehmen y col., (2005b). El tiempo de digestión que se emplea en este trabajo es el mayor de los recomendados por Oehmen y col., (2005b), es decir 20 h para asegurar una completa hidrólisis del polímero. En los apartados siguientes se detallan las condiciones cromatográficas empleadas, la metodología de preparación de muestras y el procedimiento de calibración.

3.3.1 Equipo de Cromatografía Gaseosa

El cromatógrafo de gases empleado en el análisis de X_{PHA} es de la marca comercial Agilent Technologies 6890N, Network GC System. Este cromatógrafo está equipado con una columna capilar, un inyector automático Agilent Technologies, Serie 7683B y un detector de ionización de llama (FID). Los datos se almacenan y cuantifican en un programa de ordenador diseñado por el fabricante. A continuación se detallan las condiciones cromatográficas:

Columna Capilar:	-HP-INNOWAX. Agilent 19095N-123. -Descripción: 30 m*0.538 mm*1 µm. -Modo: Flujo constante. -Flujo inicial: 15 ml/min. -Presión nominal: 10.39 psi.
Temperatura del Horno:	-Temperatura inicial: 70°C, 2 min. -Rampa: 10°C/min, 9 min. -Temperatura final: 160°C, 2 min. -Tiempo de análisis: 13 min.
Inyector:	-Modo: Split 2:1. -Temperatura del inyector: 220°C. -Gas portador: Helio. -Volumen de inyección: 1 µl.
Detector:	-Temperatura: 275°C. -Flujo de Hidrógeno: 40 ml/min. -Flujo de aire: 450 ml/min. -Flujo de Helio: 41 ml/min.

3.3.2 Preparación de la muestra

Para obtener un peso aproximado de muestra liofilizada de 50 mg se debe tomar un volumen de 50 ml. No obstante, el peso de liófilo final dependerá de los SST del fango en el momento del análisis. La muestra de fango se centrifuga durante 10 minutos a 7500 r.p.m. El sobrenadante se deshecha y se congela el precipitado a -86°C el cual se somete a un proceso de

liofilización. En esta etapa se introduce la muestra congelada en una cámara de vacío para que se separe el agua por sublimación. Mediante diversos ciclos se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua contenida en la muestra original.

Posteriormente se recogen 20–40 mg del liofilizado en un vial de vidrio de 10 ml de volumen. Se adicionan 3 ml de metanol acidificado con ácido sulfúrico al 3% y 3 ml de cloroformo y rápidamente se tapa el vial para evitar la evaporación de los reactivos empleados. Se agita el vial para permitir el buen contacto entre el fango liofilizado y los reactivos. Posteriormente se incuba la muestra a 100°C durante 20 h para favorecer la hidrólisis del polímero y su posterior esterificación. Una vez finalizada la incubación de la muestra, se enfría a temperatura ambiente, se agrega 1 ml de agua destilada y se mezcla 1 minuto empleando un agitador vortex. Finalmente se deja reposar 2 h. La agitación vigorosa produce la separación de la fase orgánica. Después del período de reposo es posible observar dos zonas bien diferenciadas: una zona inferior en la cual se encuentra la fase orgánica con el compuesto esterificado, el cual se analizará por cromatografía, y una zona superior del vial en la cual se encuentra el metanol acidificado y el agua. Para realizar el análisis se toma con una pipeta pasteur un volumen de la fase orgánica o clorofórmica y se trasvasa a una jeringa a la cual se le acopla un filtro Millex-HN de 0.45 μm de tamaño de poro. La muestra filtrada se coloca en un vial para análisis cromatográfico.

3.3.3 Procedimiento de calibración

Si bien se utiliza un dispositivo automático para realizar la inyección de la muestra en el cromatógrafo, se considera conveniente emplear un estándar interno para disminuir el error que pueda producirse en el volumen inyectado.

El patrón externo empleado es un copolímero formado por 70% de ácido 3-hidroxibutírico y 30% de ácido 3-hidroxivalérico, marca comercial Fluka Chemika, 27819, CAS N°: 92267-82-8. La empresa que comercializa el patrón, Sigma-Aldrich, asegura que el producto no se degrada con el tiempo cuando se almacena a temperatura ambiente. Sin embargo, por precaución el producto fue mantenido en refrigerador y sellado para evitar que se humedeciera. Empleando una balanza analítica, se pesan los estándares externos en el intervalo de 0.3 a 1.9 mg. Durante el pesado se debe prestar atención a la atracción por electricidad estática que pueda conducir a la pérdida de producto. La muestra del estándar se trata de la misma manera que el fango liofilizado para obtener el éster que se analizará por cromatografía gaseosa.

El patrón interno es ácido benzoico, marca comercial Panreac, 131014, el cual se incorpora en una concentración de 100 mg/l en la solución de metanol acidificado. De esta manera el patrón interno se agrega en todos los viales, los que contienen los estándares externos y los de las muestras incógnitas. Una vez analizados los estándares externos se obtienen dos rectas de calibrado, una para PHB y otra para PHV.

Es importante considerar que tanto para la medida de la muestra como de los estándares externos es conveniente estudiar la reproducibilidad de la señal analítica y la de los tiempos de retención. Para ello se deben realizar varias inyecciones. A partir de estas múltiples medidas se deben calcular algunos parámetros estadísticos que permitan determinar la reproducibilidad de los valores. En particular se ha calculado el valor medio, el coeficiente de variación y la desviación estándar de cada grupo de medidas.

3.4 PROGRAMACIÓN DE LAS EXPERIENCIAS

En este trabajo se ha propuesto calibrar el proceso de eliminación conjunta de materia orgánica y nutrientes. Por esta razón es conveniente mantener condiciones experimentales que favorezcan la eliminación tanto de materia orgánica como nitrógeno y fósforo.

Las bacterias nitrificantes requieren edades de fango elevadas para llevar a cabo la oxidación del nitrógeno amoniacal a nitrato. La cantidad de nitrato que se puede eliminar en el proceso de desnitrificación depende en gran medida del TRC del biorreactor. El parámetro cinético que más influencia tiene sobre el TRC mínimo para llevar a cabo el proceso de eliminación biológica de nitrógeno es la velocidad máxima de crecimiento, μ_{MAX} . Este parámetro en las bacterias desnitrificantes suele tener valores altos, permitiéndoles crecer a TRC relativamente bajos si en el agua influente está presente el ión nitrato. Sin embargo, la mayoría de las aguas residuales poseen una mayor concentración de amonio que de nitratos. Este hecho provoca la necesidad de aumentar el TRC para poder realizar el proceso de nitrificación-desnitrificación. Por otro lado, García-Usach (2002) estudió la influencia del TRC en el comportamiento de los diferentes tipos de bacterias que se pueden encontrar en un proceso de eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes. El intervalo de valores analizado en este trabajo fue 6 - 16 días. De esta manera comprobó que a TRC elevados disminuye la eficacia del proceso de eliminación biológica de fósforo, debido a que en la biomasa aumenta la proporción de bacterias GAO. Este incremento comienza a ser significativo a TRC de 12 días. Por estas razones, en esta tesis se ha optado por trabajar a un TRC no superior a 10 días. Teniendo en cuenta estos aspectos se decidió emplear edades de fango relativamente bajas, aproximadamente: 6, 8 y 9 días para la realización de esta fase experimental.

Para alcanzar los objetivos relacionados al procedimiento de calibración del modelo BNRM1 se ha dividido el trabajo experimental en dos fases. A

continuación se describen brevemente las tareas a desarrollar y las condiciones experimentales en cada una de estas etapas.

1-Calibración off-line del modelo BNRM1:

En esta fase del trabajo se han propuesto una serie de tareas destinadas a mejorar el procedimiento de calibración de los experimentos *off-line*. Una de las tareas propuestas es el análisis de sensibilidad de cada ensayo de calibración. Puesto que este tipo de análisis es local, es decir depende del valor de los parámetros y las variables analizadas, se considera conveniente estudiar el proceso en dos edades de fango diferentes. Esta etapa se llevará a cabo en los TRC de 6 y 8 días. De esta manera se podrá determinar si el análisis de sensibilidad de los ensayos de calibración *off-line* cambia notablemente cuando varía la edad de fango del proceso.

La fase experimental de este período se realizará con el esquema de operación 1.

2-Propuesta de modificación de la metodología de calibración del modelo BNRM1:

El objetivo final de esta tesis es lograr un procedimiento de calibración del modelo BNRM1 basado no sólo en ensayos específicos sino que además considere datos dinámicos de la planta piloto. Estos datos permitirían la identificación de los parámetros sensibles que no se determinan por medio de experimentos realizados a escala de laboratorio. Por tanto, se han planificado una serie de tareas que permitan desarrollar un procedimiento de calibración del modelo BNRM1 basado en los protocolos descritos en el apartado 1.7.3.

La propuesta de calibración del modelo que se llevará a cabo en este trabajo de investigación incluye una primera etapa de calibración *off-line* de los parámetros. En cada uno de estos experimentos se realizará un muestreo óptimo de acuerdo a los resultados del análisis de sensibilidad realizado en la fase anterior. Puesto que este análisis es local, se mantendrán condiciones

de trabajo próximas a las empleadas en la etapa anterior. Por esta razón, se ha seleccionado una edad de fango aproximada de 9 días para desarrollar las tareas propuestas.

La fase experimental de este período será realizada con el esquema de operación 2.

Además se llevará a cabo un análisis de los valores de los parámetros obtenidos mediante el procedimiento de calibración *off-line* en cada TRC. Puesto que el proceso de acumulación de fósforo presenta una gran complejidad se realizará un análisis más exhaustivo del mismo. Este estudio incluye no sólo los valores de los parámetros de las bacterias PAO, sino además, los rendimientos PHA/S_A, PHB/S_A y PHV/S_A determinados en las condiciones anaerobias y los resultados del seguimiento microbiológico del licor mezcla realizado en cada edad de fango.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

En esta sección se recogen los resultados obtenidos en este trabajo de tesis que incluyen:

- a) datos del seguimiento y operación de la planta piloto,
- b) resultados del estudio de los métodos de caracterización del agua residual,
- c) procedimiento para mejorar la metodología de calibración *off-line* del modelo BNRM1 en dos TRC diferentes,
- d) propuesta de modificación de la metodología de calibración del modelo BNRM1 y,
- e) comparación de los parámetros calibrados mediante ensayos específicos en los TRC analizados.

4.1 SEGUIMIENTO DE LA PLANTA PILOTO

La planta piloto se operó durante un período adecuado para permitir que el proceso alcance un comportamiento estable. Se considera que el estado estacionario se alcanza cuando las variables analizadas presentan un comportamiento estable durante un período aproximado de 3 veces el TRC.

Las edades de fango analizadas han sido las siguientes: 6.5 días, 8 días y 9 días. A continuación se exponen los datos experimentales recogidos de la planta piloto en cada uno de los tres estudios experimentales.

4.1.1 Estudio experimental para TRC de 6.5 días

Para el desarrollo de esta etapa del trabajo se empleó el esquema de operación 1 de la planta piloto, (ver 3.1.1). La planta piloto se ha sembrado con fango concentrado proveniente de la zona aerobia del reactor biológico

de la EDAR ubicada en el Barranco del Carraixet. A partir de este momento se ha dejado evolucionar el proceso hasta alcanzar un comportamiento aceptable de eliminación de materia orgánica y nutrientes. El influente de la planta piloto se tomó de la arqueta de salida del desarenador de dicha EDAR. Durante este período el personal responsable de la gestión de la EDAR se vio obligado a realizar recirculaciones de fango digerido a cabeza de planta en diferentes ocasiones. Este funcionamiento generó un agua residual influente con elevado contenido de SST y DQO provocando una gran variación de las concentraciones de sólidos en todos los reactores. Este comportamiento puede observarse en la Figura 20. En ella se muestran los datos de SST a partir del día 150 dado que anteriormente la planta se encontraba en un período de comportamiento inestable en el cual se realizaban mínimas analíticas. Es posible observar en dicha gráfica que el contenido de SST del reactor anaerobio es inferior, aproximadamente un 30% menos, respecto al contenido de SST del aerobio y anóxico. Esto se debe a que el aporte de SST al reactor anaerobio proviene de la corriente de recirculación del reactor anóxico y de la corriente del influente. De esta manera resulta un contenido inferior de SST respecto al de los restantes reactores. La evolución de los sólidos suspendidos totales en la planta ha estado condicionada por los del agua residual influente. Se observa que los días 187 y 242 se registraron valores elevados de SST, 5572 y 6442 mg SS/l respectivamente en el reactor aerobio. Posteriormente al disminuir el contenido de sólidos en el influente, el proceso ha evolucionado hacia un valor más bajo en todos los reactores.

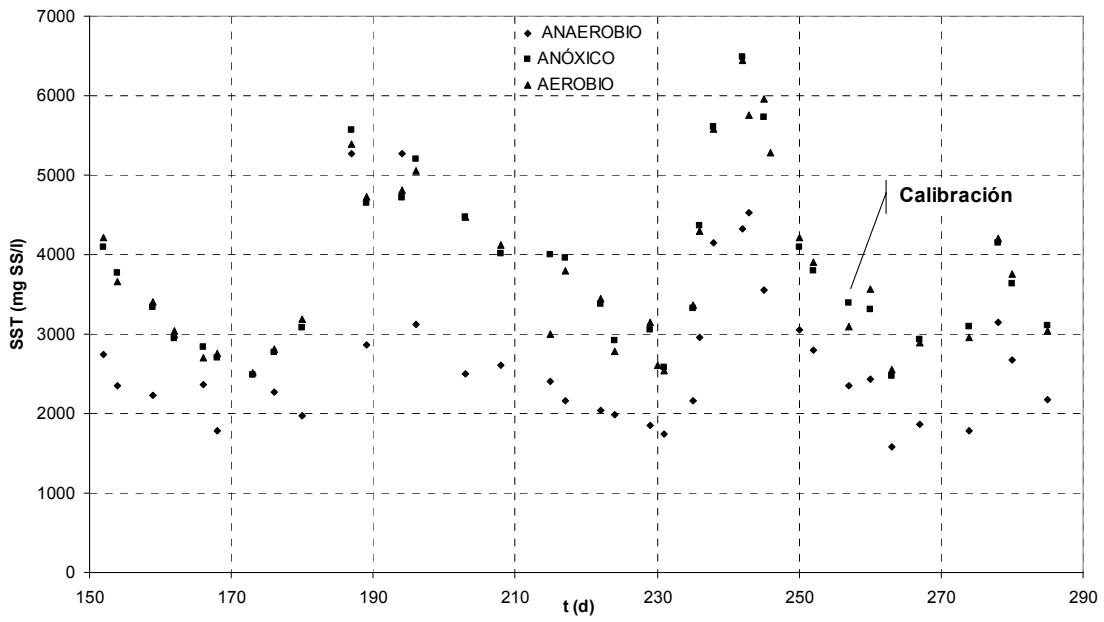


Figura 20: Evolución de la concentración de SST correspondiente al TRC de 6.5 días.

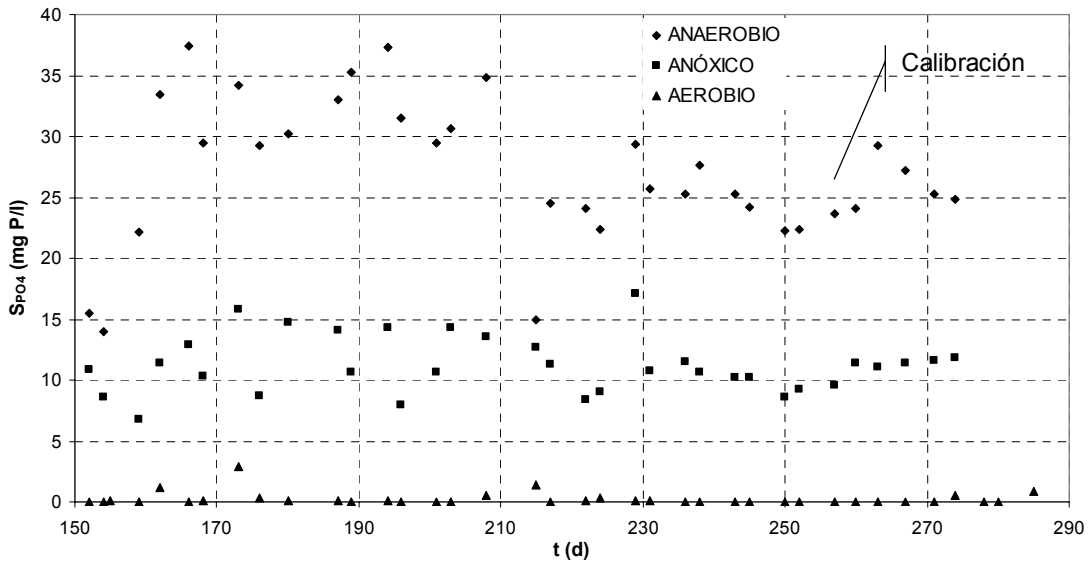


Figura 21: Evolución de la concentración de S_{PO4} correspondiente al TRC de 6.5 días.

En la Figura 21 se presenta la evolución del contenido de fósforo en forma de ortofostato (S_{PO4}) en los distintos reactores. Si bien se observa una disminución del contenido de fósforo en el reactor anaerobio, esto responde a un cambio en el caudal de alimento sintético que entraba a la planta. Dada

la alta concentración de AGV que estaban entrando con el influente y para evitar un crecimiento no deseado de bacterias GAO se procedió a disminuir la cantidad de AGV que se incorporan a través del alimento sintético. En todo el período considerado la concentración de S_{PO_4} en el reactor aerobio es bastante reducida logrando una eliminación prácticamente total de este nutriente en el efluente.

En la Figura 22 se muestran los datos experimentales de la concentración de nitrógeno en forma de amonio (S_{NH_4}) en la entrada y en el reactor aerobio. En el influente se observa una disminución del contenido de S_{NH_4} el cual es mínimo hacia el día 230 aproximadamente. Es posible notar en la Figura 23 que la concentración mínima de S_{NO_3} se alcanza aproximadamente en este período.

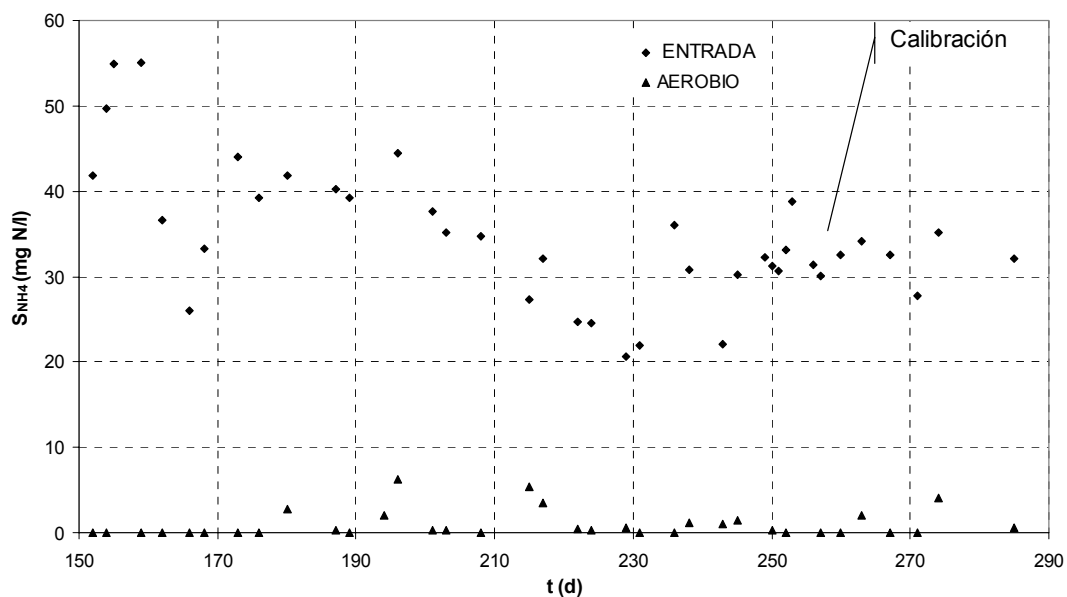


Figura 22: Evolución de la concentración de S_{NH_4} correspondiente al TRC de 6.5 días.

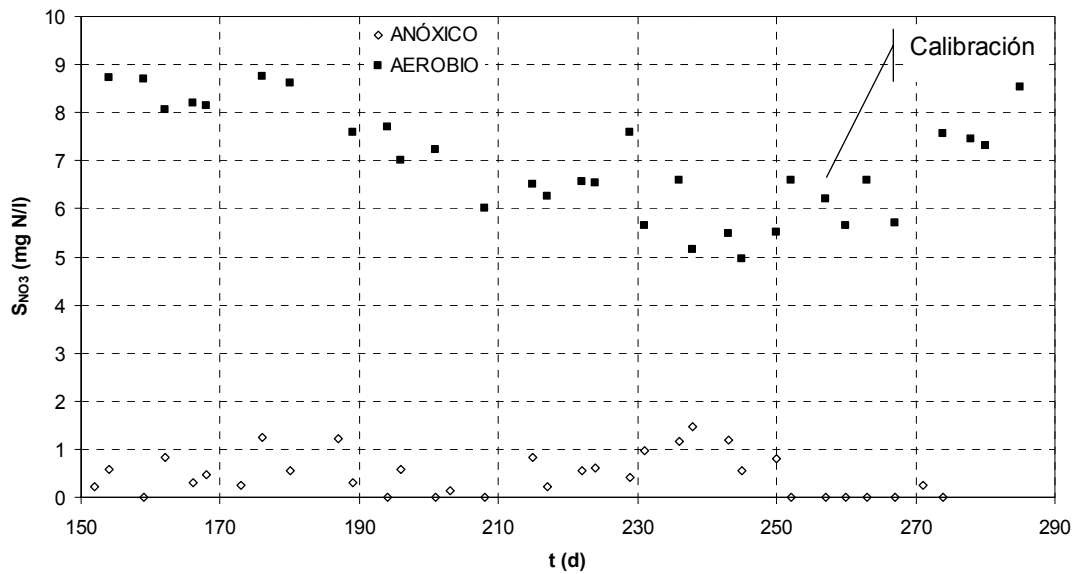


Figura 23: Evolución de la concentración de S_{NO_3} correspondiente al TRC de 6.5 días.

Durante este período de trabajo resultó difícil mantener estable el contenido de SST en los reactores. Sin embargo, se consideró apropiado calibrar el día 257 puesto que el resto de las variables analizadas mostraban un comportamiento bastante estable incluida la edad de fango.

4.1.2 Estudio experimental para TRC de 8 días

Este estudio experimental también se realizó con el esquema de operación 1. El inicio de este período de trabajo coincidió con la finalización de un período vacacional en el cual la planta piloto no estuvo en funcionamiento. Por esta razón se realizó una siembra similar a la del período anterior. El influente se tomó de la arqueta de salida del desarenador de la EDAR del Carraixet. En este período la calidad del agua de entrada presentó un comportamiento más estable que el observado anteriormente.

En la Figura 24 se presentan los datos experimentales de SST de los tres reactores. Si bien se observa un aumento de los sólidos el día 190, el comportamiento es más estable que el observado en el estudio experimental correspondiente al TRC de 6.5 días.

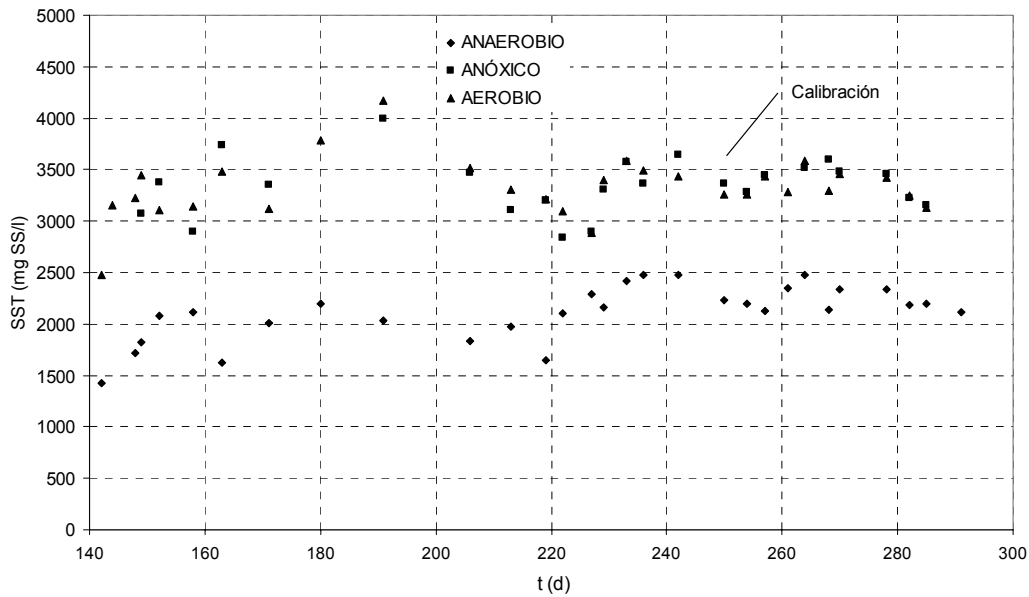


Figura 24: Evolución de la concentración de SST correspondiente al TRC de 8 días.

En la Figura 25 se muestran los datos de la concentración de fósforo soluble S_{PO_4} . Se observa un incremento del contenido de fósforo en el reactor anaerobio y anóxico, siendo el valor más alto el del día 190. La evolución del contenido de nitrógeno en forma de amonio S_{NH_4} en la entrada y en el reactor aerobio se presenta en la Figura 26. En este período de trabajo se observa que el S_{NH_4} de la entrada describe una menor variación a la observada en el período anterior, entrando además una menor concentración de amonio con el influente. La concentración de nitratos S_{NO_3} del reactor aerobio y del anóxico se muestra en Figura 27. Se observa que el contenido de S_{NO_3} del reactor aerobio es más bajo que la misma concentración en el período anterior. Esto se debe a que el contenido de amonio del influente ha sido menor durante este período de trabajo.

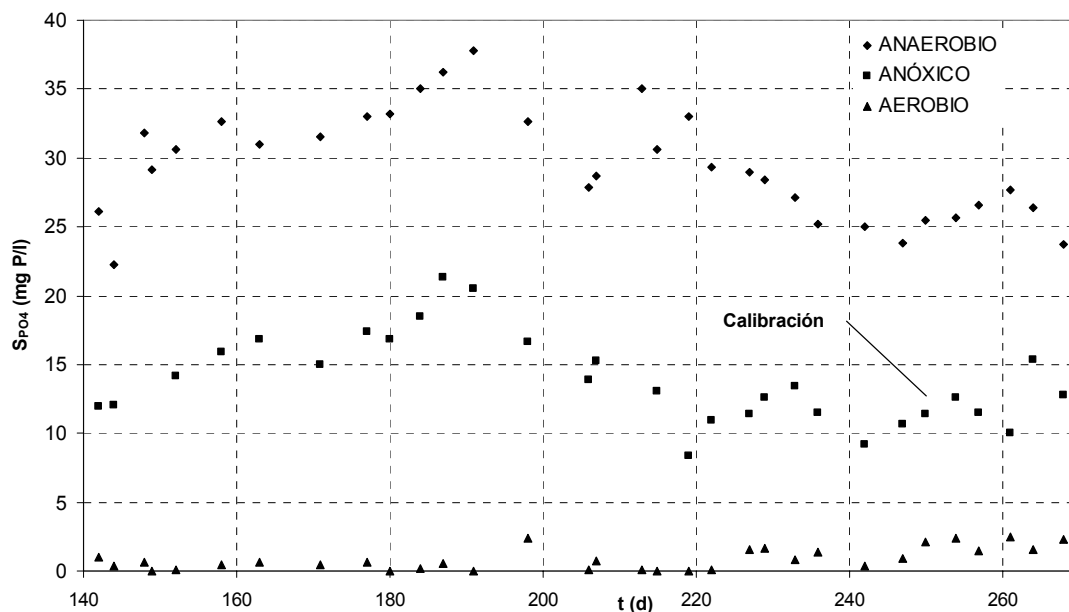


Figura 25: Evolución de la concentración de S_{PO_4} correspondiente al TRC de 8 días.

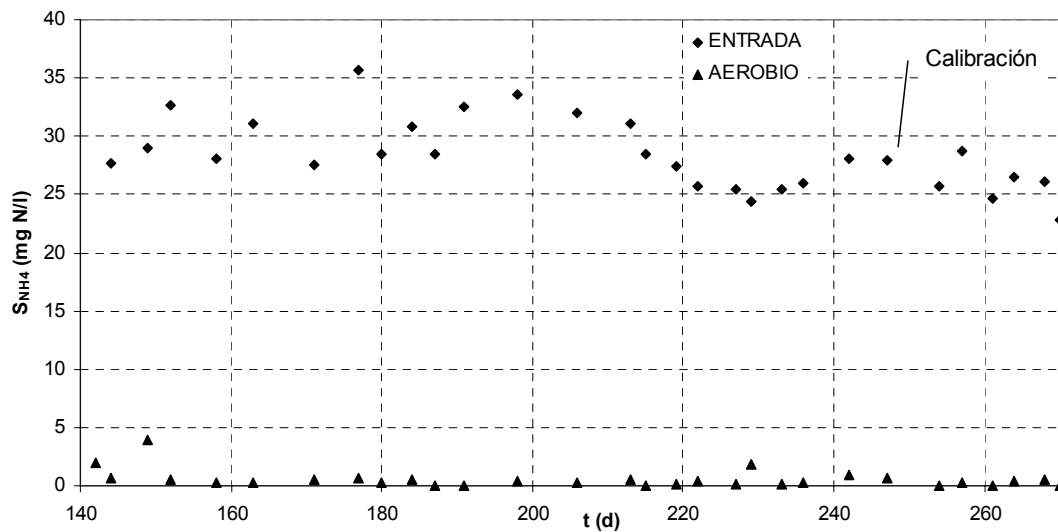


Figura 26: Evolución de la concentración de S_{NH_4} correspondiente al TRC de 8 días.

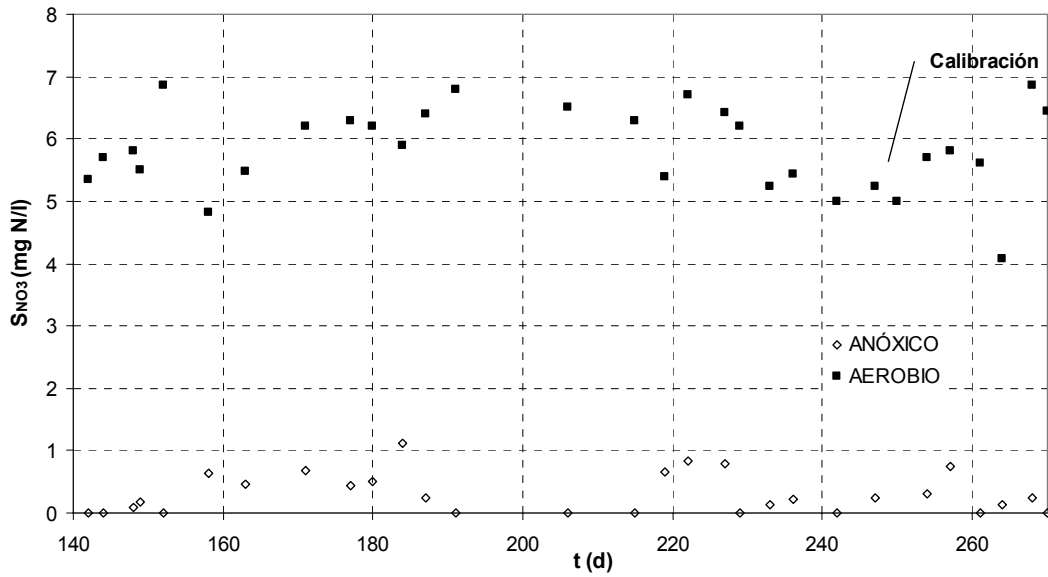


Figura 27: Evolución de la concentración de S_{NO_3} correspondiente al TRC de 8 días.

La calibración del modelo se realizó el día 250 de este período al observar un comportamiento estable en las variables analizadas y en la edad de fango.

4.1.3 Estudio experimental para TRC de 9 días

Para el desarrollo de esta etapa del trabajo se empleó el esquema de operación 2 de la planta piloto (ver apartado 3.1.2). En este período de trabajo se tomó el influente de la arqueta de salida del decantador primario de la EDAR del Barranco del Carraixet. De esta manera se pretende evitar los problemas de entradas puntuales de SST puesto que es un agua residual decantada. En la Figura 28 se observa la evolución de los SST en los tres reactores. Si bien las concentraciones muestran una relativa estabilidad, entre los días 214 y 221 se produjo una disminución apreciable de la concentración de sólidos en todos los reactores. Esto se debió a una pérdida de sólidos por problemas con la bomba de purga de los mismos. Esta disminución en la concentración de SST ocasionó problemas en la eliminación de fósforo. En la Figura 29 se observa que la concentración de fósforo soluble disminuye en estos días. La concentración de fósforo en el

reactor aerobio durante todo el período es más alta respecto a la misma variable en los dos TRC anteriores estudiados. Este hecho puede estar originado en el aumento del contenido de nitratos que se recircula del reactor anóxico al anaerobio. El caudal de esta corriente de recirculación se incrementó para lograr un aumento en la concentración de biomasa y de esta manera mejorar la eliminación de fósforo. Si bien el resultado no fue el deseado se optó por trabajar en esta condición para mantener una concentración adecuada de SST en la zona anaerobia.

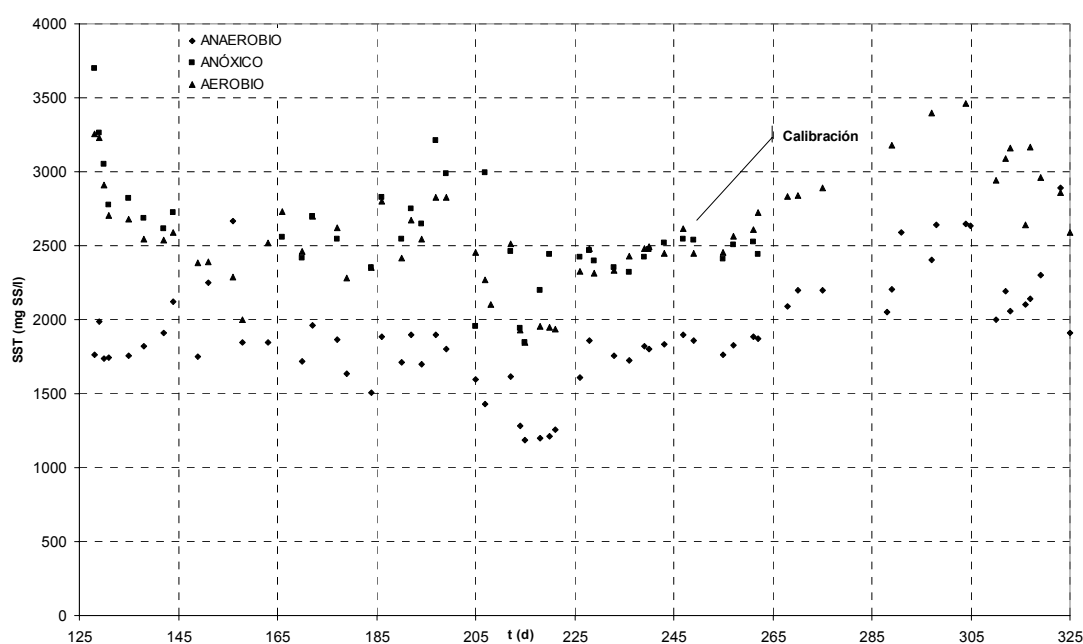


Figura 28: Evolución de la concentración de SST correspondiente al TRC de 9 días.

En la Figura 30 se presentan los datos de S_{NH_4} en el influente y el reactor aerobio. Aunque se observa un aumento paulatino de la concentración de amonio en el influente a lo largo de todo el período, el sistema es capaz de nitrificar prácticamente toda la carga de amonio que entra. Es posible notar que la concentración de S_{NH_4} en el reactor aerobio se mantiene por debajo de 1 mg N/l.

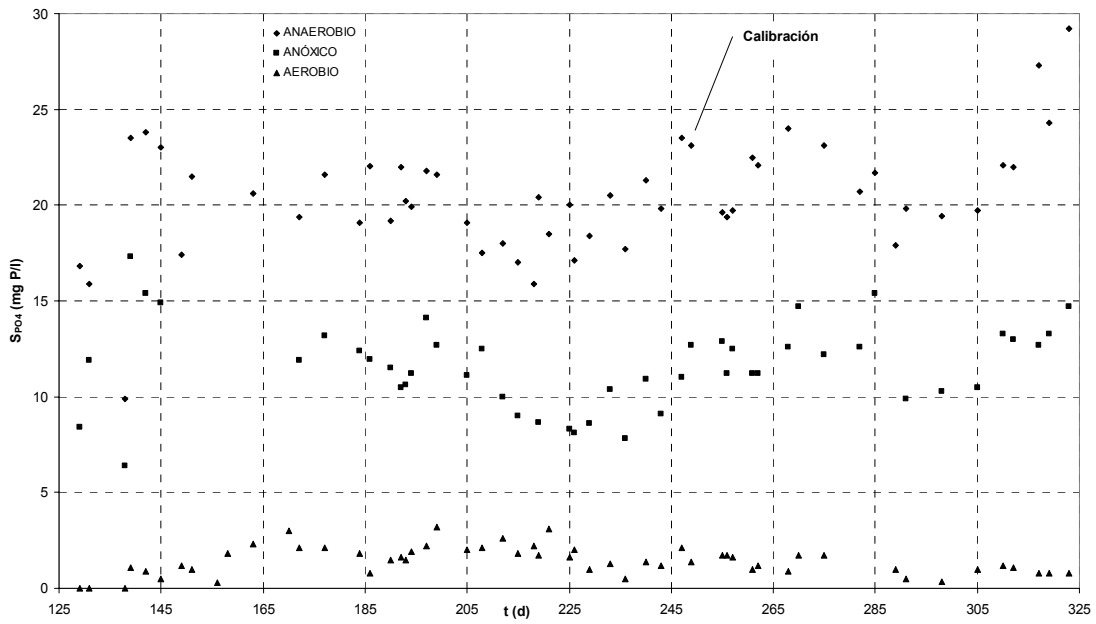


Figura 29: Evolución de la concentración de S_{PO_4} correspondiente al TRC de 9 días.

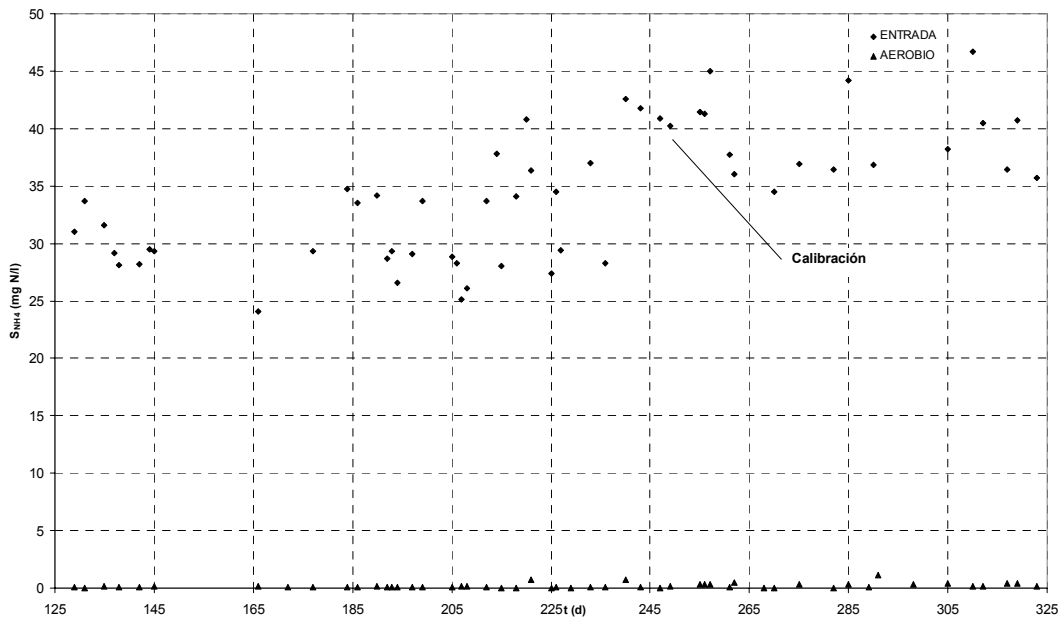


Figura 30: Evolución de la concentración de S_{NH_4} correspondiente al TRC de 9 días.

En la Figura 31 se muestra la evolución del nitrógeno en forma de nitratos. El contenido de S_{NO_3} describe una disminución gradual durante el período de trabajo. Se ha observado un incremento en la concentración de materia orgánica rápidamente biodegradable en este período. Si las bacterias heterótrofas desnitrificantes tienen disponibilidad de esta materia orgánica entonces pueden lograr una mayor desnitrificación.

El procedimiento de calibración se realizó el día 249 al observar un comportamiento estable en las variables analizadas.

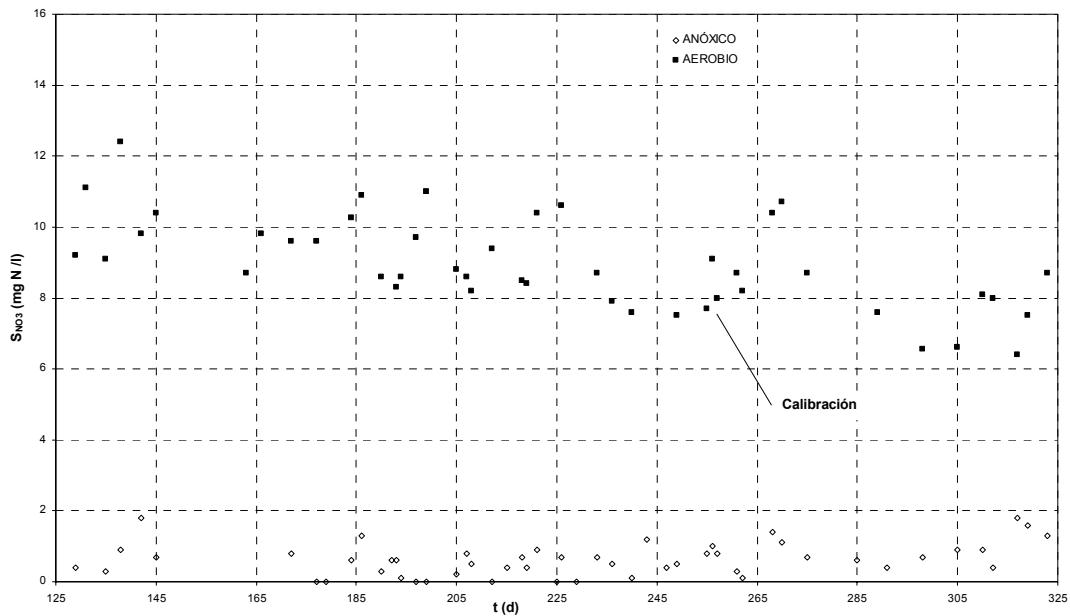


Figura 31: Evolución de la concentración de S_{NO_3} correspondiente al TRC de 9 días.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL

Para llevar a cabo un estudio comparativo de los distintos métodos de caracterización del agua residual analizada se utilizaron muestras de tres EDAR diferentes de las cuales se da una breve descripción en la Tabla 23.

Tabla 23: Descripción de las EDAR y características del influente

	EDAR de Abarán (Murcia)	Planta Piloto de Carraixet (Valencia)	EDAR de Pinedo (Valencia)
Características del agua residual	Agua residual doméstica e industrial	Agua residual doméstica e industrial	Agua residual doméstica e industrial
Población equivalente	10586	--	361605
Caudal tratado (m ³ /día)	2694	2	119264
Tratamiento de depuración	Fango activado anóxico-aerobio con adición de coagulante y desinfección con radiación ultravioleta	Fango activado anaerobio-anóxico-aerobio	Fango activado anóxico-aerobio con adición de coagulante y desinfección con radiación ultravioleta

El estudio de los métodos de caracterización se ha dividido en tres secciones:

- 1- Influencia del tamaño de filtro en el fraccionamiento del agua residual.
- 2- Influencia del cociente inicial F_0/X_0 en la determinación de la fracción S_S por medio del análisis respirométrico.
- 3- Comparación de las fracciones S_S y X_S obtenidas con el método de caracterización físico-químico y respirométrico.

A continuación se presentan los resultados obtenidos.

4.2.1 Influencia del tamaño de filtro en el fraccionamiento del agua residual

El agua residual y el fango biológico analizados en esta sección se tomaron de la planta piloto ubicada en la EDAR del Barranco del Carraixet. El estudio se repitió en dos fechas, 08/03/05 y 26/04/05, en cada una de las cuales se desarrollaron las siguientes tareas:

- 1) Análisis respirométrico de las fracciones solubles obtenidas con los filtros: 0.45 μm (Análisis A) y 0.1 μm (Análisis B), ver apartado 3.2.2.2.
- 2) Caracterización físico-química a partir de las muestras solubles obtenidas con los dos tamaños de filtros.

En la Figura 32 se muestran los datos experimentales de la OUR de los experimentos realizados. Los análisis respirométricos emplean un cociente inicial F_0/X_0 bajo. De esta manera la concentración de biomasa en el reactor es importante, favoreciendo la eliminación rápida de la materia orgánica fácilmente biodegradable. Después de añadir el agua residual filtrada se produce un incremento importante de los valores de la OUR, debido a la presencia de esta materia orgánica. Una vez se ha consumido esta fracción disminuye rápidamente el valor de la OUR hasta alcanzar nuevamente el estado de respiración endógena. En este tipo de ensayo no se produce apenas crecimiento celular, de manera que el nivel endógeno que se alcanza posteriormente a la adición de agua residual es prácticamente igual al medido antes de la adición. Los datos experimentales de la OUR de los análisis respirométricos A (agua filtrada con 0.45 μm) y B (agua filtrada con 0.1 μm) presentan un comportamiento similar a lo largo de todo el ensayo.

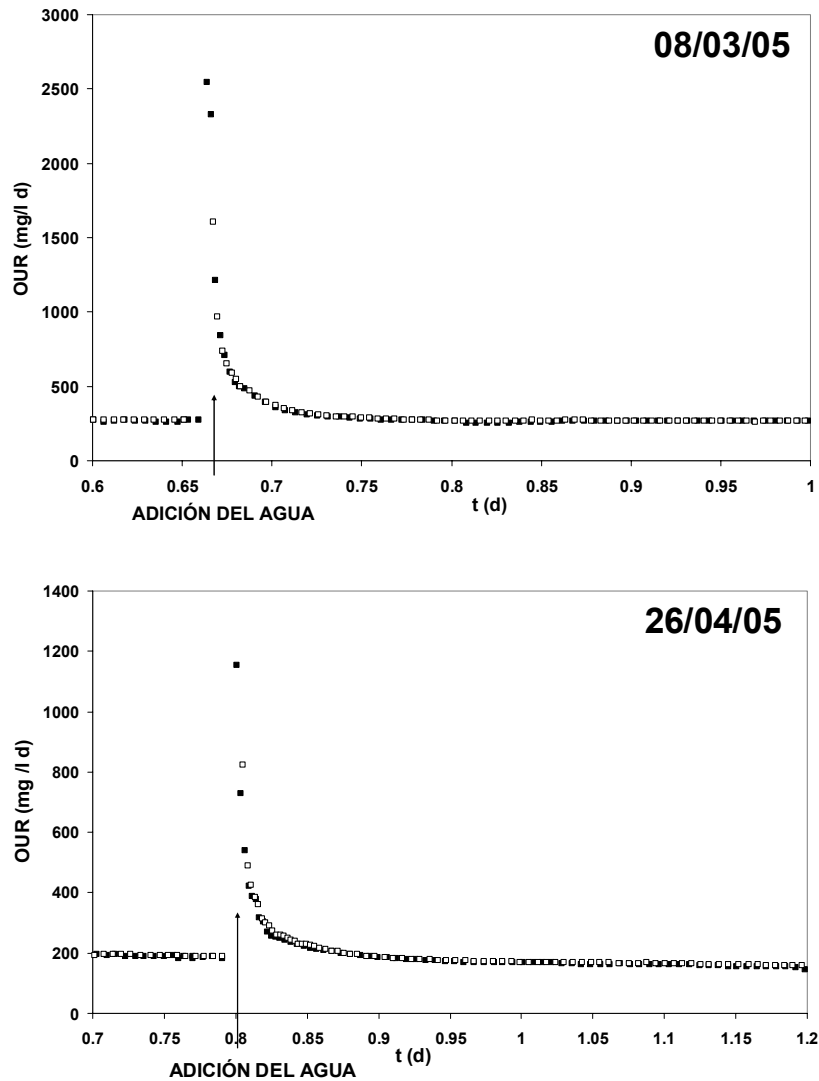


Figura 32: Datos experimentales de la OUR del influente filtrado con dos tamaños de filtro: (□) 0.45 μm (Análisis A) y (■) 0.1 μm (Análisis B).

A partir de los datos experimentales de cada análisis se determinó la fracción S_s . En la Figura 33 se presenta esquemáticamente cómo se procede con los datos. El área que se encuentra por debajo de la curva de la OUR y por encima de la respiración endógena (zona sombreada) representa el oxígeno consumido debido a la adición de materia orgánica en el sistema.

La fracción S_s se obtiene de la Ec. 37 (pag. 96), conocido el parámetro Y_H , rendimiento de las bacterias heterótrofas. Este coeficiente se puede determinar a partir de datos experimentales o recurrir a datos bibliográficos. El valor que tome este parámetro es crítico en el cálculo de S_s puesto que una variación de un 10% conduce a un cambio del 15% en la

estimación de esta fracción de materia orgánica. Por esta razón se ha considerado apropiado determinar el valor de Y_H en las EDAR analizadas. La metodología se basa en un análisis respirométrico del agua residual filtrada con un tamaño de filtro de $0.1 \mu\text{m}$ (Penya-Roja y col., 2002), el cual se describe en el apartado 4.3.1.1.1. En este análisis se determina la DQO soluble degradada en el ensayo y se cuantifica el consumo de oxígeno que se produce al añadir la materia orgánica fácilmente biodegradable. Estos datos permiten calcular el rendimiento Y_H por medio de la Ec. 37. El valor obtenido en este período ha sido $Y_H=0.58 \text{ mg DQO/mg DQO}$.

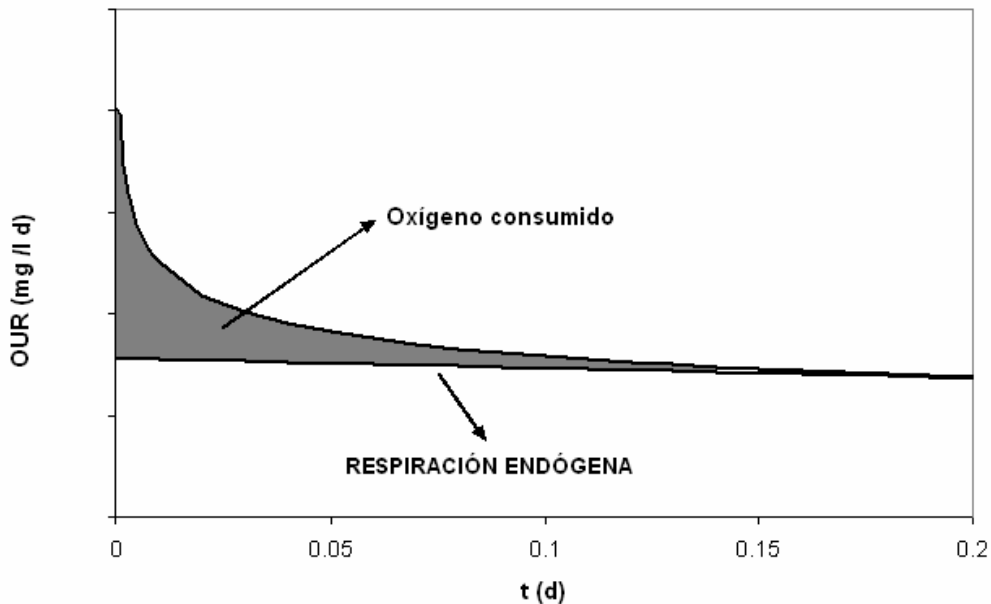


Figura 33: Oxígeno consumido para el cálculo de la fracción S_s .

En cada una de estas muestras se aplicó el método de caracterización físico-químico, ver apartado 3.2.1. Para esto se determinó la concentración de DQO y DBO_L de la componente total del influente y efluente de la EDAR, y la DQO y DBO_L de las fracciones solubles obtenidas con los filtros de 0.45 y $0.1 \mu\text{m}$ del influente y del efluente. Estos datos se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: DQO (mg DQO/l) y DBO_L (mg DQO/l) del influente y efluente.

	08/03/2005		26/04/2005	
	Influente	Efluente	Influente	Efluente
DQO _{TOTAL}	624	87	504	71
DQO _{SOL 0.45}	135	34	82	26
DQO _{SOL 0.1}	102	30	57	18
DBO _{L TOTAL}	394	42	225	21
DBO _{L SOL 0.45}	78	15	35	9
DBO _{L SOL 0.1}	79	14	35	9

A partir de los datos de DQO y DBO_L de la Tabla 24 se determinaron las fracciones de materia orgánica empleando el método físico-químico. La componente de materia orgánica soluble inerte, S_I, se obtiene por medio de la Ec. 25, y el contenido de materia orgánica fácilmente biodegradable S_S por medio de la Ec. 29. Las componentes particuladas X_I y X_S se pueden calcular con la Ec. 30 y la Ec. 32, respectivamente. Cada componente de materia orgánica se obtuvo a partir de los datos de DBO_L y DQO de las dos fracciones solubles, 0.45 y 0.1 µm.

Tabla 25: Componentes de materia orgánica del influente.

		08/03/05		26/04/05	
		0.45 µm	0.1 µm	0.45 µm	0.1 µm
Respirométrico	S _S (mg DQO/l)	66	62	35	32
Físico químico	S _I (mg DQO/l)	19	16	17	9
	S _S (mg DQO/l)	116	86	65	48
	X _S (mg DQO/l)	278	308	160	177
	X _I (mg DQO/l)	211	214	262	270

El resultado de la caracterización físico-química se recoge en la Tabla 25. Además, se han incorporado los valores de S_S calculados por el método respirométrico. Si bien el análisis propuesto se ha realizado en dos fechas únicamente, de los datos obtenidos se deduce que:

- 1- Los tamaños de filtro analizados no generan una diferencia sustancial en la fracción S_S del método respirométrico. El valor de S_S obtenido de

la fracción soluble filtrada con $0.45 \mu\text{m}$ es ligeramente superior a la fracción soluble de $0.1 \mu\text{m}$.

- 2- En la Tabla 24 se observa que los datos de DBO_L de las dos fracciones solubles presentan valores similares, tanto en el influente como en el efluente. Sin embargo, la concentración de DQO soluble no describe el mismo comportamiento. La fracción obtenida con el filtro de $0.45 \mu\text{m}$ muestra valores de DQO soluble mayores que la fracción obtenida con el filtro de $0.1 \mu\text{m}$, siendo esta diferencia más acentuada en el influente que en el efluente. El contenido de DQO soluble de la fracción de $0.45 \mu\text{m}$ es casi 30 mg DQO/L superior que el mismo contenido de la fracción de $0.1 \mu\text{m}$. De esta manera, el empleo del filtro de $0.45 \mu\text{m}$ genera una sobreestimación de las fracciones S_I y S_S y una subestimación de la fracción X_S .
- 3- De las DBO_L solubles de ambas fracciones y de los datos respirométricos se observa que el tamaño de poro no ejerce una influencia marcada en la determinación de las fracciones biodegradables. Esto puede explicarse si se considera que la materia orgánica rápidamente biodegradable debe entrar al espacio celular sin pasar por una etapa de hidrólisis. Su tamaño está determinado por la capacidad de las proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana celular que permiten el paso de la materia orgánica al interior del microorganismo. Con los datos obtenidos se puede considerar que la materia orgánica rápidamente biodegradable tiene un tamaño menor a $0.1 \mu\text{m}$, mientras que la materia coloidal que presenta lenta biodegradabilidad tiene un tamaño superior a $0.45 \mu\text{m}$.
- 4- El tamaño de filtro condiciona el valor de DQO soluble. El contenido de DQO considera toda la materia orgánica (biodegradable y no biodegradable). La componente soluble no biodegradable es un sustrato complejo que puede tener un perfil más variado de tamaño y por lo tanto la DQO soluble puede presentar diferencias marcadas según el filtro empleado.

Conforme a los resultados expuestos, el filtro de 0.1 μm permite realizar un fraccionamiento más adecuado del agua residual. Por esta razón, este filtro se empleará en el estudio de caracterización y en el procedimiento de calibración.

4.2.2 Influencia de F_0/X_0 en la determinación de la fracción S_s por medio del análisis respirométrico

En este apartado se ha propuesto un esquema experimental que permita estudiar la influencia del cociente inicial F_0/X_0 en la determinación de la fracción S_s por medio del análisis respirométrico. Por esta razón, se ha planteado la realización de una serie de análisis con distintos cocientes iniciales F_0/X_0 .

El agua residual se ha tomado de las tres EDAR descritas en la Tabla 23 en distintas fechas. En la Tabla 26 se presenta la información correspondiente de cada muestra así como los análisis respirométricos realizados en cada una de ellas.

Tabla 26: Muestras analizadas en el estudio de caracterización del agua residual.

EDAR	Fecha	Nombre	Análisis respirométricos
Pinedo	21/12/04	P1	B, C
	21/06/05	P2	B, C
Planta Piloto de Carraixet	01/03/05	C1	B, C
	28/02/06	C2	B, C, E
	21/03/06	C3	B, C, E
	18/04/06	C4	B, C, D
	25/04/06	C5	B, C, D
Abarán	05/04/06	A1	B, C, D

B: F_0/X_0 bajo, agua filtrada con 0.1 μm
C: F_0/X_0 bajo, agua sin filtrar
D: F_0/X_0 medio, agua sin filtrar
E: F_0/X_0 alto, agua sin filtrar

Los análisis respirométricos B y C se han realizado en todas las muestras. Si bien ambos experimentos emplean un valor bajo de F_0/X_0 , en el primero

se añade agua residual filtrada con $0.1 \mu\text{m}$ mientras que en el análisis C se añade agua residual sin filtrar (total). El análisis D emplea un valor intermedio de F_0/X_0 con agua residual sin filtrar y se ha implementado en las muestras C4, C5 y A1. Finalmente en las muestras C2 y C3 se ha llevado a cabo el análisis E con agua sin filtrar y un F_0/X_0 elevado.

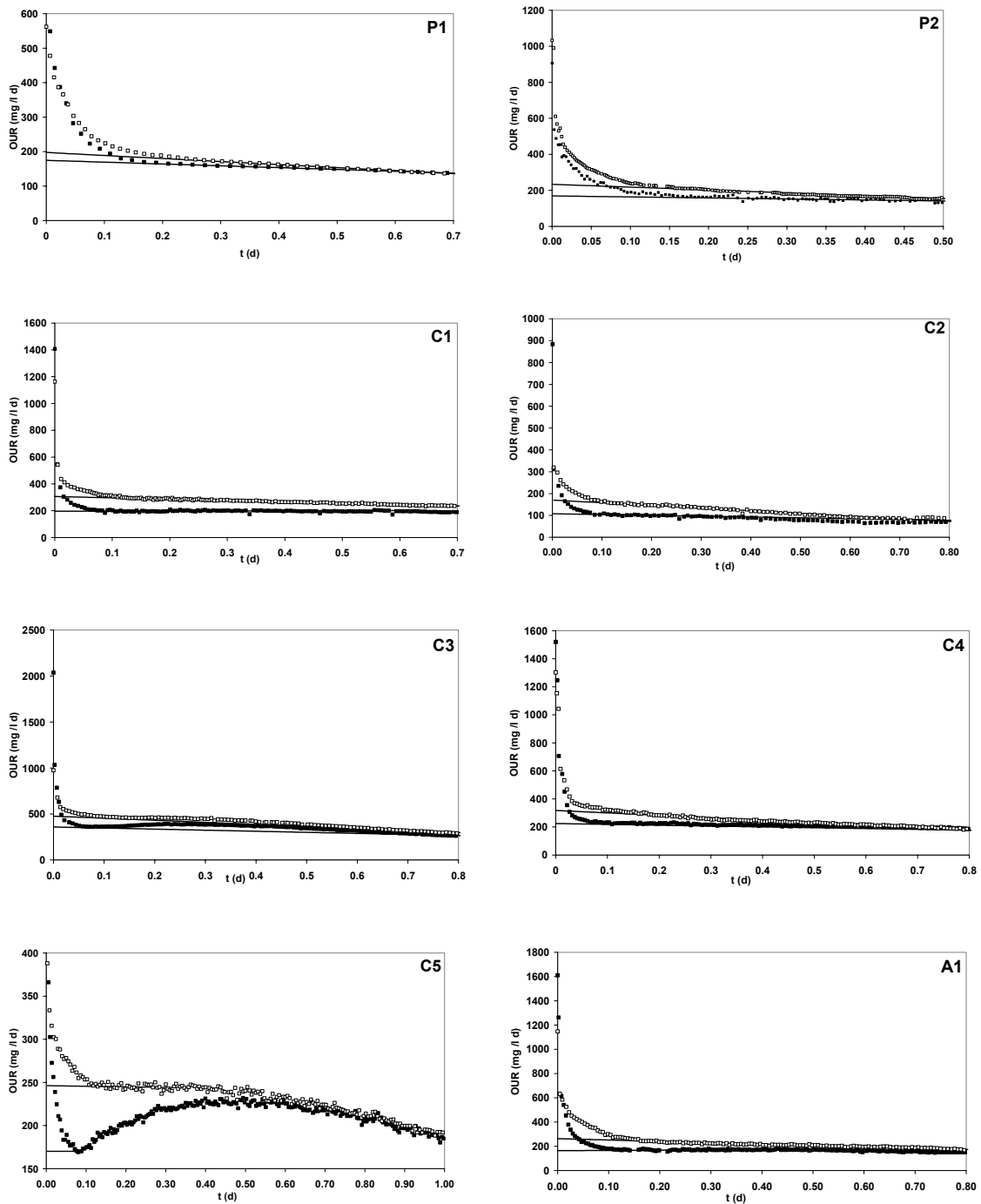


Figura 34: Datos experimentales de la OUR. Análisis respirométricos: (■) B: y (□) C.

En la Figura 34 se presentan los ensayos respirométricos B y C de todas las muestras analizadas. En cada una de estas gráficas se expone la curva de la OUR desde el momento en el cual se ha añadido el agua a analizar. Por motivos de comparación, en cada gráfica se presentan los dos registros respirométricos. La curva en estos análisis describe un comportamiento similar al observado en la Figura 32, lo cual se debe a que el factor empleado F_0/X_0 es pequeño. La curva del análisis C presenta valores superiores de la OUR respecto a los valores obtenidos con el análisis B que emplea agua filtrada. En el experimento C, el agua residual sin filtrar contiene la materia orgánica rápida y lentamente biodegradable con lo cual se espera que los valores de la OUR obtenidos de su análisis sean superiores a los del agua filtrada, análisis B, que contiene únicamente la fracción rápidamente biodegradable. En cada una de las gráficas se han incorporado las rectas calculadas con los puntos de la zona lineal de cada curva. En el caso del análisis respirométrico B esta recta representa la respiración endógena. En cambio, en el análisis que emplea agua sin filtrar la recta está asociada a la velocidad del consumo de oxígeno a medida que se hidroliza la materia orgánica lentamente biodegradable más la respiración endógena.

En la muestra C5 se ha encontrado un comportamiento diferente en la curva realizada con un F_0/X_0 bajo y agua filtrada con $0.1 \mu\text{m}$ (análisis B). Luego de la adición del agua residual se produce un descenso rápido de los valores de la OUR debido al consumo de la materia orgánica fácilmente biodegradable. Una vez alcanzado el mínimo, los valores de la OUR se incrementan notablemente debido a la hidrólisis del fango. Si bien el fango empleado se mantuvo en estado endógeno durante 2 días aproximadamente, luego de la adición del agua se observó este comportamiento indicando que el fango no estaba totalmente en ese estado. La curva obtenida con agua total (análisis C) también muestra valores de OUR elevados, aproximándose a la curva del análisis B hacia el final del experimento. Se considera que la hidrólisis de la materia orgánica lentamente biodegradable presente en el análisis C enmascara el proceso de hidrólisis del fango. Para el cálculo de la fracción S_s a partir de los datos del análisis del agua filtrada se consideró como valor

endógeno el mínimo alcanzado por la curva. En el caso de análisis del agua sin filtrar se aproximó la recta con los valores de OUR del intervalo 0.16 d a 0.34 d. El comportamiento observado en la muestra C5 pone de manifiesto la dificultad y necesidad de emplear un fango en estado endógeno que permita un cálculo adecuado de la velocidad de consumo de oxígeno en condiciones endógenas.

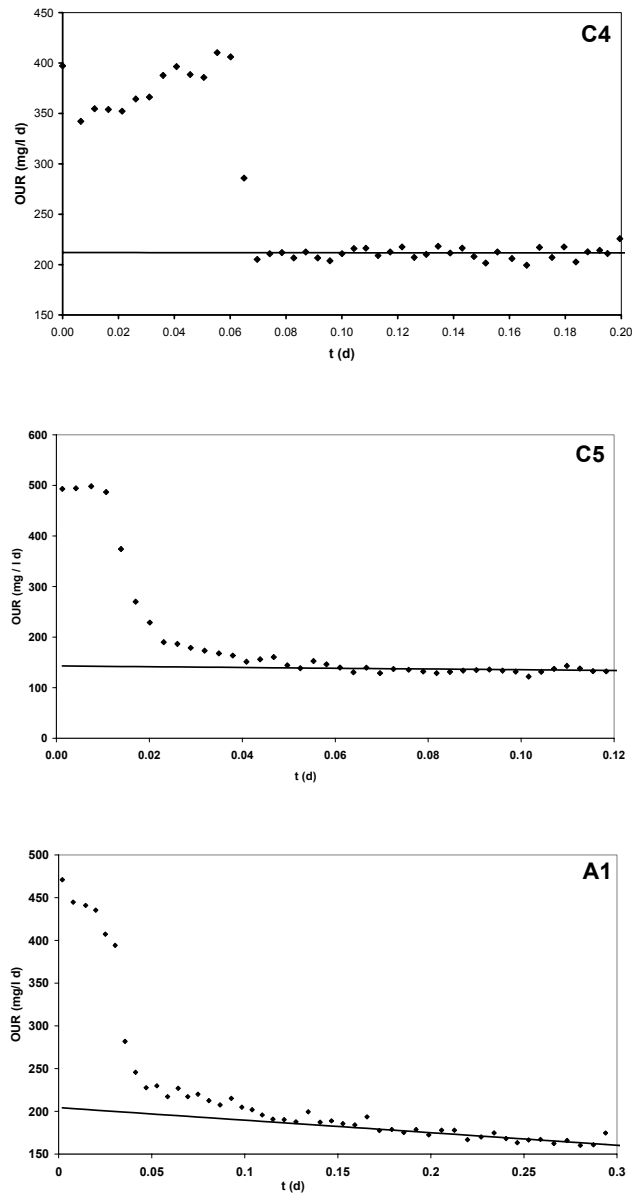


Figura 35: Datos experimentales de la OUR. Análisis respirométrico D (♦).

En las muestras C4, C5 y A1 se implementó el análisis respirométrico D. El ensayo se ha realizado con un volumen de fango y del influente sin filtrar de tal manera que F_0/X_0 se encuentre en el intervalo 0.4-1 (mg DQO/mg SSV). Las gráficas obtenidas se presentan en la Figura 35. Si bien este análisis tiene una menor proporción de microorganismos respecto a los experimentos B y C, el contenido de biomasa presente es importante. Esta condición genera valores elevados de la OUR al inicio del ensayo, los cuales se mantienen en dicho nivel hasta que se consume totalmente la fracción S_s . En ese momento se produce un descenso pronunciado en la velocidad del consumo de oxígeno. En cada gráfica de la Figura 35 se muestra la recta que representa la velocidad con la cual se consume el oxígeno a medida que se hidroliza la materia orgánica lentamente biodegradable más la velocidad de respiración endógena. Esta recta permite determinar el consumo de oxígeno debido a la componente S_s presente en el agua residual.

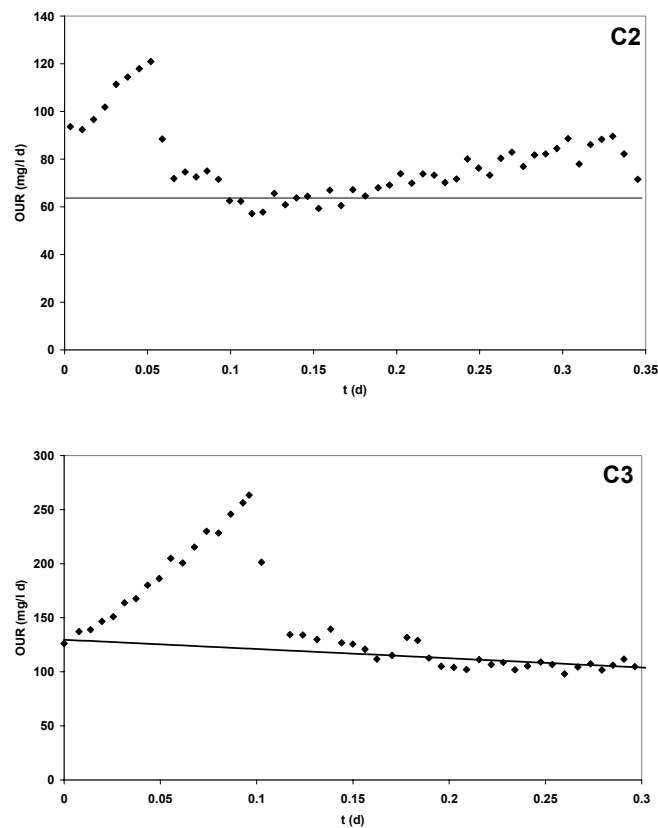


Figura 36: Datos experimentales de la OUR. Análisis respirométrico E (♦).

En las muestras C2 y C3 se realizó también el análisis respirométrico E en el que se analiza el influente sin agregarle fango endógeno. De esta manera los microorganismos presentes en el agua residual son los responsables del consumo de oxígeno. En este ensayo la disponibilidad de sustrato es mucho mayor que en los análisis restantes, lo cual favorece el crecimiento de los microorganismos. En las curvas de la Figura 36 se observa que el valor inicial de la OUR es bajo, mostrando un incremento posterior muy pronunciado. Este aumento, que está asociado al crecimiento de los microorganismos, se produce hasta agotar la materia orgánica fácilmente biodegradable. En este tipo de ensayo ocurre un cambio importante en las condiciones del experimento puesto que la concentración de microorganismos aumenta. Para estimar la fracción S_s con los datos del análisis E se ha considerado que en el momento que se produce la disminución rápida de la OUR esta componente ha sido totalmente consumida. Cabe destacar, que el cálculo de la fracción S_s se lleva a cabo empleando la Ec. 37 en la cual se asume que la concentración de la biomasa es constante durante todo el ensayo. Esta suposición es una limitación para la implementación de la Ec. 37 dado que en los análisis que emplean un valor elevado de F_0/X_0 se produce el crecimiento de los microorganismos.

En la Tabla 27 se muestran los valores de la relación inicial F_0/X_0 de cada experimento. Los análisis B y C se han realizado con el mismo volumen de fango endógeno y se les ha agregado el mismo volumen de agua. Dado que el análisis B emplea influente filtrado el valor de F_0/X_0 es notablemente inferior al obtenido con el análisis C.

Tabla 27: Valores de F_0/X_0 (mg DQO/mg SSV).

		Análisis respirométricos			
		B	C	D	E
MUESTRAS	P1	0.0524	0.1174		
	P2	0.0248	0.0732		
	C1	0.0149	0.2313		
	C2	0.0130	0.0747		2.2394
	C3	0.0122	0.0721		2.1184
	C4	0.0256	0.1524	0.9625	
	C5	0.0109	0.0711	0.4307	
	A1	0.0228	0.1273	0.9567	

Tabla 28: Parámetro Y_H (mg DQO/mg DQO).

		Y_H
MUESTRAS	P1	0.61
	P2	
	C1	0.58
	C2	0.61
	C3	
	C4	
	C5	
	A1	0.61

A partir de los registros de la OUR de los diferentes experimentos realizados se procedió a calcular la fracción S_s con la Ec. 37. Puesto que esta ecuación necesita el valor del rendimiento Y_H , se ha determinado experimentalmente este parámetro para cada EDAR según la metodología propuesta por Penya-Roja y col., (2002). Este método se describe en el apartado 4.3.1.1.1. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 28. El valor de Y_H de la muestra C1 de la planta piloto del Carraixet es diferente al rendimiento de las restantes muestras. Esto se debe a que pertenecen a diferentes períodos de trabajo.

En la Tabla 29 se recogen los datos obtenidos de las fracciones S_s en cada una de las muestras analizadas.

Tabla 29: Fracción S_s (mg DQO/l)

		Análisis Respirométrico			
		B	C	D	E
MUESTRAS	P1	70	64		
	P2	64	65		
	C1	35	38		
	C2	33	29		9
	C3	58	52		15
	C4	110	114	43	
	C5	26	24	27	
	A1	108	117	34	

A partir de los resultados obtenidos es posible realizar las siguientes consideraciones:

- 1- El análisis respirométrico B que emplea un valor bajo de F_0/X_0 y agua filtrada con un filtro de $0.1 \mu\text{m}$ permite obtener en forma adecuada la fracción S_s . Esta consideración se basa en que el análisis B se lleva a cabo en las mismas condiciones en las cuales se determina el valor del rendimiento Y_H . Este parámetro se obtiene por respirometría con un F_0/X_0 bajo, en la misma condición experimental del fango de la planta piloto, y agua filtrada con un filtro de $0.1 \mu\text{m}$.
- 2- El análisis C emplea un valor inicial bajo de F_0/X_0 y agua residual sin filtrar. Con estas condiciones ha sido posible obtener un valor similar de S_s al del análisis del agua filtrada (B) en cada muestra.
- 3- Con los análisis respirométricos D y E, los cuales emplean un valor medio y alto de F_0/X_0 , respectivamente, no fue posible obtener valores similares de S_s a los del análisis B. Únicamente se ha logrado un valor semejante en el caso del análisis D de la muestra C5, lo cual puede deberse al valor relativamente bajo de F_0/X_0 de este experimento, ver Tabla 27.
- 4- Al aumentar el valor del cociente F_0/X_0 cambian las condiciones ambientales en el reactor incrementándose la disponibilidad de sustrato por microorganismo presente. En estas condiciones las bacterias pueden conducir su metabolismo hacia un mayor crecimiento y una menor producción de energía. Es decir, cuando el valor de F_0/X_0 aumenta las bacterias pueden destinar una mayor proporción de DQO para crecimiento que la considerada por el rendimiento Y_H , en detrimento de la producción de energía dada por el término $(1-Y_H)$.
- 5- En la determinación de la fracción S_s por medio del análisis respirométrico es conveniente mantener condiciones experimentales similares a las empleadas en la determinación del parámetro Y_H . De esta manera se garantiza que la bacteria emplee la misma proporción de DQO para crecimiento que la considerada en el rendimiento Y_H . Este parámetro se obtiene en las mismas condiciones experimentales que se encuentra el fango de la planta piloto.

4.2.3 Estudio comparativo de los métodos de caracterización para la determinación de las fracciones S_s y X_s

En este apartado se ha llevado a cabo la comparación de las metodologías de caracterización físico-química y respirométrica para valorar las fracciones S_s y X_s de las muestras de la sección anterior.

Como se concluye en el apartado anterior, la componente S_s del análisis respirométrico se obtiene en forma adecuada por medio del ensayo B. La fracción X_s se determina a partir de los datos de la OUR de los análisis respirométricos realizados con agua filtrada y sin filtrar (B y C), empleando la Ec. 38. La diferencia de los valores de la OUR entre ambas curvas se debe a la presencia de materia orgánica lentamente biodegradable en el análisis C. Los resultados obtenidos para cada muestra junto con los obtenidos mediante el método físico-químico descrito en el apartado 3.2.1 se recogen en la Tabla 30.

Tabla 30: Fracciones S_s y X_s (mg DQO/l)

		Análisis Respirométrico		Físico-Químico	
		S_s	X_s	S_s	X_s
MUESTRAS	P1	70	46	71	148
	P2	64	90	70	141
	C1	35	287	46	476
	C2	33	160	36	160
	C3	58	270	80	457
	C4	110	236	141	439
	C5	26	133	27	206
	A1	108	280	124	411

Conforme a los resultados obtenidos es posible realizar las siguientes consideraciones:

- 1- En general, con los métodos de caracterización físico-químico y respirométrico es posible obtener valores similares de la fracción S_s .
- 2- Si bien en la muestra C2 el valor de la fracción X_s obtenida con ambos

métodos de caracterización coinciden, en las muestras restantes el valor de X_S del método respirométrico es muy inferior al del método físico-químico. La componente X_S es un sustrato complejo compuesto de la materia orgánica lentamente biodegradable del influente y de los productos de la lisis celular. El análisis respirométrico se realiza en un intervalo de tiempo muy corto, con lo cual sólo es posible determinar la fracción de materia orgánica fácilmente hidrolizable. Si el influente contiene una proporción de X_S muy lentamente hidrolizable, esta fracción no podrá detectarse por medio del análisis respirométrico. Cabe destacar que el modelo BNRM1 (así como el ASM2d) considera una única velocidad de hidrólisis K_H la cual representa todo el sustrato lentamente biodegradable. No tiene en cuenta la posible existencia de diferentes velocidades de hidrólisis en dicha fracción.

- 3- La diferenciación entre la velocidad de respiración endógena y la velocidad de hidrólisis de la materia orgánica lentamente biodegradable es una tarea difícil. Un cambio mínimo en la pendiente de estas rectas se traduce en una variación significativa en el valor de X_S .
- 4- La calidad del agua residual no influye en los resultados obtenidos. Las conclusiones obtenidas son independientes de la procedencia del agua analizada.

4.3 METODOLOGÍA DE CALIBRACIÓN DEL MODELO BNRM1.

La metodología de calibración del modelo BNRM1 empleada actualmente se basa en el procedimiento propuesto por Peña-Roja y col., (2002). Este procedimiento permite obtener los parámetros cinéticos y estequiométricos de las bacterias autótrofas, heterótrofas y PAO mediante ensayos *off-line* en los cuales se aíslan los procesos característicos de estos grupos de bacterias.

En este trabajo de tesis se ha propuesto mejorar la metodología empleada actualmente para obtener los parámetros más sensibles del modelo BNRM1. Para lograr este objetivo se han planificado, en primer lugar, una serie de tareas con el propósito de mejorar cada uno de los ensayos de calibración *off-line*. En segundo lugar, se ha planteado una propuesta de calibración del modelo BNRM1. Los resultados del trabajo realizado se describen a continuación.

4.3.1 Calibración *off-line* del modelo BNRM1

Este procedimiento se realiza sometiendo a la biomasa a un número elevado de situaciones diferentes, asegurando con esta metodología una elevada fiabilidad de los valores de los parámetros. Del tratamiento individualizado de los datos obtenidos en cada uno de los ensayos, se obtiene información sobre los parámetros estequiométricos y cinéticos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la información se refiere al producto del parámetro y la fracción de la biomasa activa de cada tipo de microorganismo. Para conocer el valor de los parámetros es necesario un tratamiento global de la información obtenida en los ensayos individuales. Los parámetros calibrados mediante la metodología propuesta por Peña-Roja y col., (2002) para cada grupo de bacterias son:

Bacterias heterótrofas: Y_H , μ_H , b_H , K_F , η_H

Bacterias autótrofas: μ_A , b_A , K_{NH_4}

Bacterias PAO: Y_{PAO} , Y_{PO_4} , μ_{PAO} , q_{PHA} , b_{PAO} , K_A , K_{PHA} , K_{MAX} , K_{IPP} ,
 η_{PAO} , η_{PP}

En esta tesis se han estudiado las siguientes propuestas con el fin de mejorar este procedimiento de calibración:

1) Incorporar los datos experimentales de la concentración del polímero polihidroxialcanoato, X_{PHA} , en el ensayo de calibración de las bacterias PAO en condiciones aerobias. La técnica de medición se ha descrito en el apartado 3.3, la cual permite cuantificar a los polímeros PHB y PHV. La concentración de X_{PHA} es la suma de estos dos compuestos. En la función objetivo a minimizar se considerarán los datos experimentales de la velocidad de consumo oxígeno, OUR, el fósforo soluble, S_{PO_4} y el polímero X_{PHA} .

2) Realizar un estudio de la calidad de los datos experimentales mediante el análisis de sensibilidad de los ensayos de calibración *off-line*. Para esto se obtendrán las funciones de sensibilidad que serán aplicadas a cada uno de los ensayos de calibración, (ver apartado 1.7.2.1).

Para el desarrollo de este estudio la planta piloto se operó con el Esquema 1 en dos edades de fango: 6.5 y 8 días.

Los resultados de este apartado se han organizado en dos secciones. En la primera se expone todo el procedimiento de calibración *off-line* realizado en las dos edades de fango y en la segunda parte se muestra el análisis de sensibilidad desarrollado para cada uno de los experimentos.

4.3.1.1 Procedimiento de calibración off-line

En esta sección se exponen todos los ensayos de calibración *off-line*. Este procedimiento está basado en el desarrollado por Peña-Roja y col., (2002), al que se le han realizado diversas modificaciones entre las que cabe

destacar la incorporación de las medidas de la concentración del polímero X_{PHA} en el ensayo de las bacterias PAO en condiciones aerobias.

4.3.1.1 Bacterias Heterótrofas

Las bacterias heterótrofas son responsables de la degradación aerobia y anóxica del sustrato orgánico fermentable S_F . Mediante balances estequiométricos y aplicando las ecuaciones cinéticas que definen estos procesos, es posible obtener el rendimiento y la velocidad máxima del crecimiento, la constante de semisaturación y el factor de reducción para el proceso de desnitrificación realizado por estas bacterias.

a. Rendimiento de las bacterias heterótrofas (Y_H)

Por cada unidad de DQO degradada se forma una cantidad Y_H de microorganismos, consumiendo una cantidad igual a $1-Y_H$ de oxígeno. Este proceso denominado respiración permite a las bacterias la producción de energía. La cantidad de DQO degradada se puede calcular determinando analíticamente la DQO soluble en el instante inicial del experimento y la DQO soluble al terminar el registro del consumo de oxígeno disuelto

La metodología consiste en adicionar una cantidad de agua residual filtrada (DQO soluble) a un reactor discontinuo de laboratorio con fango activado en condiciones endógenas. Se añade además tiourea en una concentración de 20 mg/l para inhibir el proceso de nitrificación. Inmediatamente después de la adición de sustrato, se inicia el registro de la OUR hasta que su valor se mantenga prácticamente constante. En la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos para los dos TRC. A los valores de la OUR medidos se le deben restar los correspondientes a la OUR endógena, que se estima a partir del ajuste de los últimos puntos de las gráficas de la Figura 37. De esta manera es posible determinar el oxígeno consumido debido exclusivamente a la degradación de la DQO añadida. La integración de la

curva de la evolución de la velocidad del consumo de oxígeno para cada estado estacionario desarrollado se muestra en las gráficas de la Figura 38.

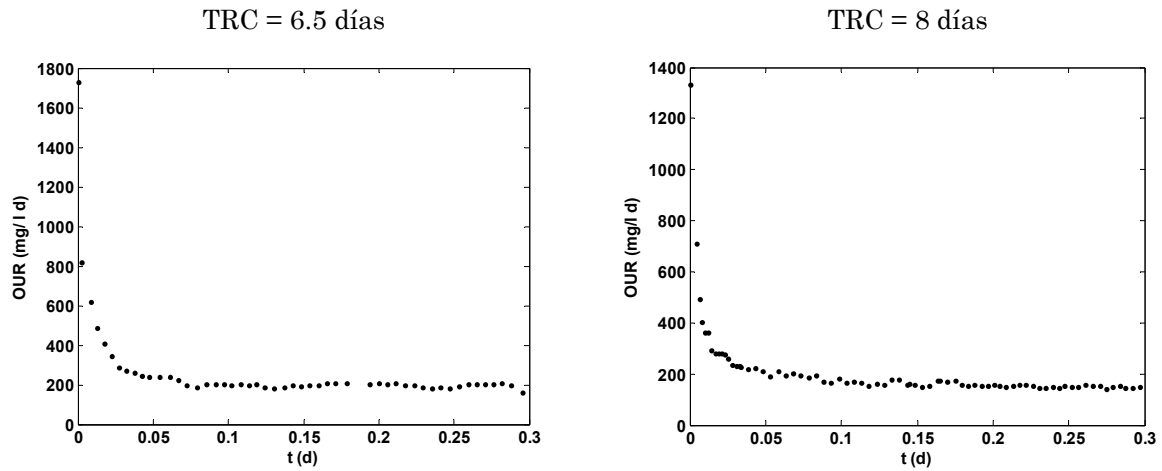


Figura 37: Evolución temporal de OUR.

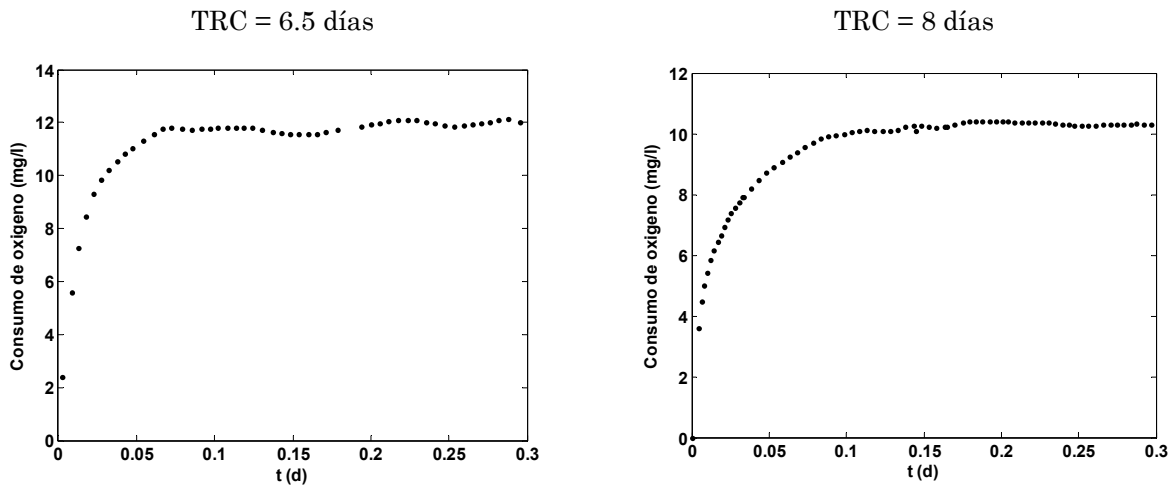


Figura 38: Evolución temporal del oxígeno consumido.

El valor del rendimiento Y_H puede estimarse a partir de la ecuación siguiente:

$$Y_H = \frac{DQO_{degradada} - \int OUR dt}{DQO_{degradada}} \tag{Ec. 39}$$

En la Tabla 31 se muestran las fracciones de oxígeno consumido, DQO degradada y el valor del parámetro Y_H obtenido en cada ensayo.

Tabla 31: Consumo de oxígeno, DQO degradada y valor de la Y_H de cada TRC estudiado.

TRC	6.5 días	8 días
S_{O_2} consumido (mg DQO/l)	12.0	10.4
S_F degradada (mg DQO/l)	30.7	25.0
Y_H (mg DQO/mg DQO)	0.61	0.58

b. Parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos de las bacterias heterótrofas, se agregan diferentes cantidades de agua residual filtrada con $0.1 \mu\text{m}$, de DQO biodegradable conocida, al fango activado en condiciones endógenas. Al agua residual utilizada se añade tiourea en una concentración de 20 mg/l para inhibir el proceso de nitrificación. La OUR se registra antes de la adición del sustrato (OUR_{END}) y en el momento de la adición (OUR_{MAX}).

La OUR_{END} viene dada por la siguiente expresión:

$$OUR_{\text{END}} = \frac{1 - Y_H}{Y_H} \mu_H \frac{S_{\text{END}}}{K_F + S_{\text{END}}} X_H \quad \text{Ec. 40}$$

S_{END} es la DQO biodegradable en el reactor asociada a la muerte y lisis de las bacterias.

La OUR_{MAX} viene dada por:

$$OUR_{\text{MAX}} = \frac{1 - Y_H}{Y_H} \mu_H \frac{S_{\text{END}} + S_{\text{AD}}}{K_F + S_{\text{END}} + S_{\text{AD}}} X_H \quad \text{Ec. 41}$$

S_{AD} es la DQO biodegradable añadida.

Si de la ecuación Ec. 40 se despeja S_{END} y se reemplaza en la Ec. 41, OUR_{MAX} queda expresada en función de $\mu_H X_H$ y K_F , dado que Y_H es conocida. Ajustando por mínimos cuadrados la Ec. 41 a los datos experimentales se pueden obtener dichos parámetros. En la Figura 39 se muestran los datos experimentales y el ajuste realizado para cada TRC. Cada punto experimental de estas gráficas representa un ensayo en el cual se determina

la OUR antes de añadir el sustrato biodegradable (OUR_{END}) y la OUR posterior a la adición. La diferencia entre estos dos valores resulta ser la OUR máxima (OUR_{MAX}). A medida que la concentración de sustrato aumenta también lo hace el valor de OUR_{MAX} hasta alcanzar una zona en la cual es independiente de la concentración del sustrato.

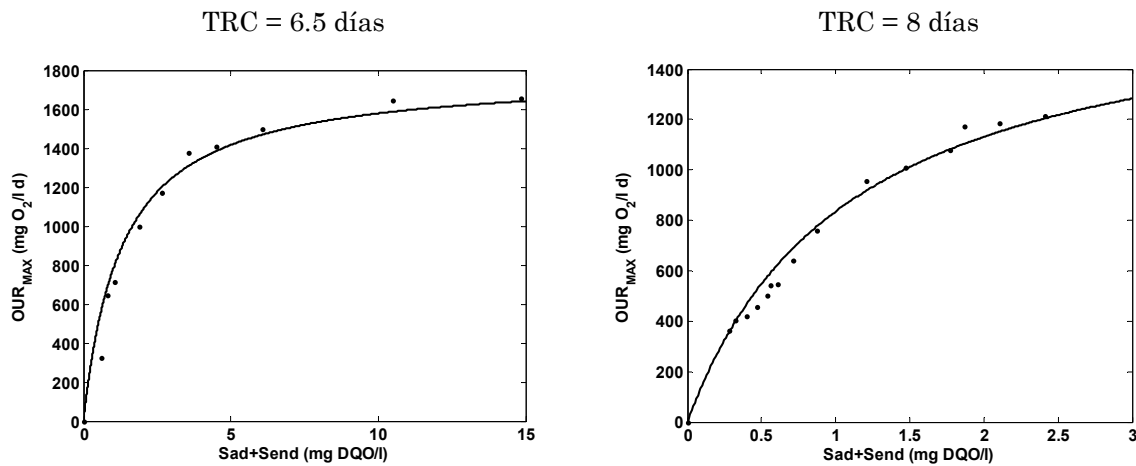


Figura 39: Velocidad de consumo de oxígeno respecto a la concentración inicial de sustrato. (●): experimental, (—) ajuste del modelo.

El ajuste de los parámetros se realizó con el programa MATLAB 7.1 empleando la función de minimización condicionada FMINCON. Esta función permite establecer límites de variación de los parámetros. En la Tabla 32 se presentan los parámetros obtenidos como resultado del ajuste de los datos experimentales.

Tabla 32: Parámetros ajustados de la curva de Monod de las bacterias heterótrofas.

TRC	6.5 días	8 días
$\frac{1-Y_H}{Y_H} \mu_H X_H$ (mg DQO/l d)	1784.00	1760.00
K_F (mg DQO/l)	1.30	1.1

4.3.1.1.2 Bacterias Autótrofas

Estas bacterias participan en el proceso de nitrificación empleando la energía liberada en la oxidación del ión NH_4^+ a NO_3^- para llevar a cabo sus funciones vitales. Dado que son bacterias específicas que actúan sobre un

sustrato determinado, se considera un rendimiento fijo e igual a 0.24 mg O/mg N. En este estudio se determinan los parámetros cinéticos únicamente.

El ensayo es similar al realizado con las bacterias heterótrofas. Se emplea el mismo fango y se añaden cantidades conocidas de una solución patrón de amonio. En este caso se tiene:

$$\text{OUR}_{\text{nitrificación}} = \frac{4.57 - Y_A}{Y_A} \mu_{\text{AUT}} \frac{S_{\text{NH}_4}}{K_{\text{NH}_4} + S_{\text{NH}_4}} X_{\text{AUT}} \quad \text{Ec. 42}$$

En este caso se considera nula la oxidación de amonio endógeno. En la Figura 40 se observan los datos experimentales y el ajuste logrado.

El ajuste por mínimos cuadrados de la Ec. 42 permite obtener los valores de los parámetros recogidos en la Tabla 33. En esta tabla se observa una importante disminución del término cinético que considera la velocidad máxima de consumo de oxígeno por nitrificación entre el TRC de 6.5 días y el de 8 días. Este menor valor se justifica por la menor concentración de amonio en el influente que entra a la planta piloto en el TRC de 8 días.

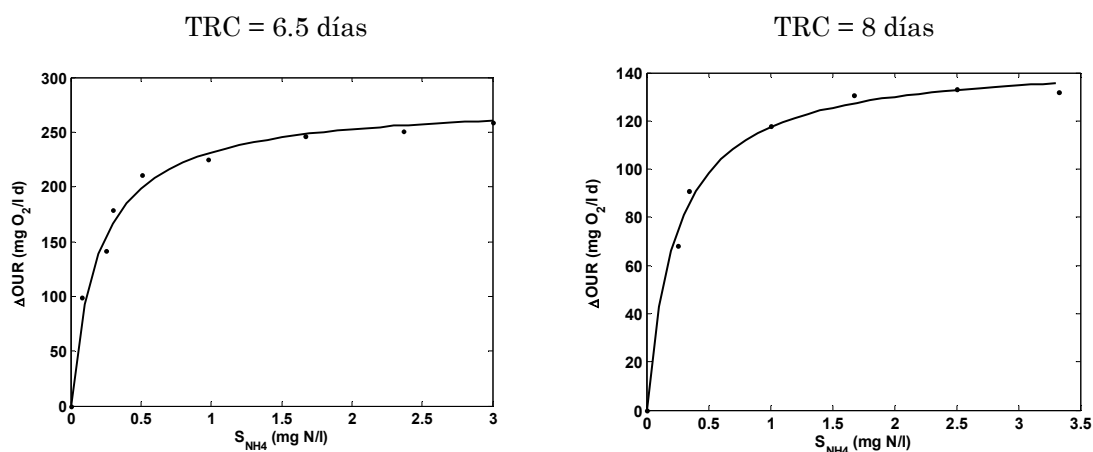


Figura 40: ΔOUR respecto a la concentración inicial de S_{NH_4} en cada experimento. (●): experimental, (—) ajuste del modelo.

Tabla 33: Parámetros ajustados de la curva de Monod de las bacterias autótrofas.

TRC	6.5 días	8 días
$\frac{4.57 - Y_A}{Y_A} \mu_{AUT} X_{AUT}$ (mg DQO/l d)	270.00	145.71
K_{NH_4} (mg N/l)	0.20	0.24

4.3.1.1.3 Bacterias PAO

Estos microorganismos participan en el proceso de depuración de acuerdo al mecanismo descrito en el apartado 1.4.3. Para la determinación de los parámetros específicos de este proceso se han llevado a cabo experimentos en condiciones anaerobias, anóxicas y aerobias.

a. Determinación de los parámetros cinéticos q_{PHA} y K_A

Estos coeficientes caracterizan el proceso anaerobio. El parámetro q_{PHA} es la velocidad a la cual estas bacterias toman ácidos volátiles de cadena corta y K_A es la constante de semisaturación y representa la afinidad existente entre estas bacterias y el sustrato. Para este experimento se emplea fango en condiciones endógenas. Dado que se desea estudiar el comportamiento anaerobio de las bacterias PAO, debe asegurarse la ausencia total de aceptores de electrones. Una vez alcanzadas estas condiciones, se añade una concentración conocida de ácido acético y se registra la disminución del contenido del ácido en el reactor, empleando una frecuencia de muestreo lo más alta posible (entre 2 y 5 minutos). La evolución de dicha concentración en el reactor viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{dS_A}{dt} = -q_{PHA} \frac{S_A}{K_A + S_A} X_{PAO} \tag{Ec. 43}$$

Si se considera el producto $q_{PHA} X_{PAO}$ como un único parámetro es posible ajustar los datos experimentales obtenidos a la Ec. 43. El ensayo se realiza tres veces, empleando distintas concentraciones iniciales de ácido acético.

En la Figura 41 se observan los datos experimentales de cada ensayo y el ajuste por mínimos cuadrados obtenido en cada TRC.

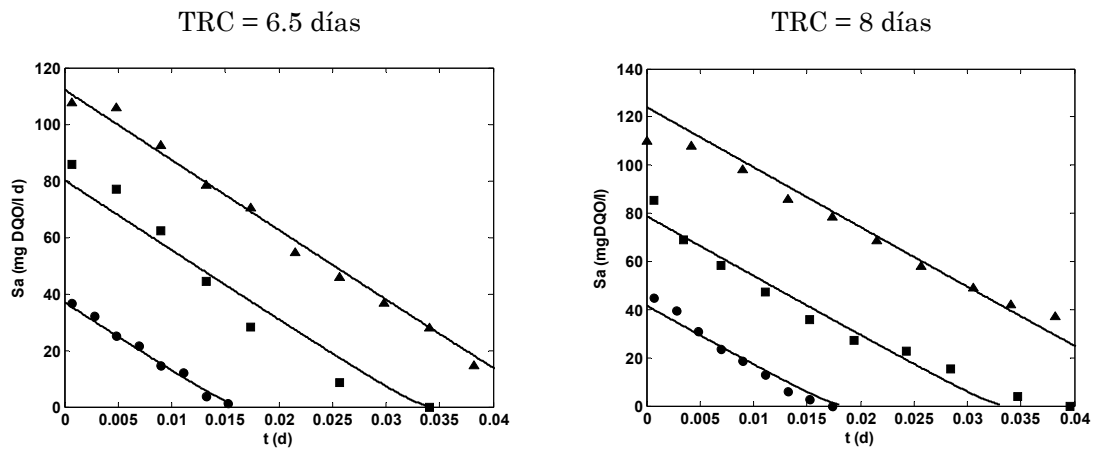


Figura 41: Evolución temporal del ácido acético en el ensayo anaerobio. (●) Reactor 1, (■) Reactor 2, (▲) Reactor 3, (—) ajuste del modelo.

Los resultados del ajuste se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34: Parámetros de las bacterias PAO en condiciones anaerobias.

TRC	6.5 días	8 días
$q_{\text{PHA}}X_{\text{PAO}}$ (mg DQO/l d)	2448.00	2520.00
K_A (mg DQO/l)	1.00	1.00

El fango empleado en este ensayo se utiliza posteriormente en la determinación de los parámetros de las bacterias PAO que caracterizan su comportamiento aerobio y anóxico.

b. Parámetro estequiométrico Y_{PO_4}

Este parámetro se obtiene a partir de los datos experimentales del apartado anterior. Se emplea el registro de la concentración de ácido acético, S_A , y la concentración de fósforo soluble, S_{PO_4} , el cual en condiciones anaerobias es liberado al medio. Se lleva a cabo un ajuste por mínimos cuadrados del incremento de S_{PO_4} respecto al consumo de S_A . En la Figura 42 se muestran los datos experimentales y el ajuste logrado en cada TRC. La pendiente de la recta obtenida es el parámetro Y_{PO_4} el cual se muestra en la Tabla 35 para cada edad de fango.

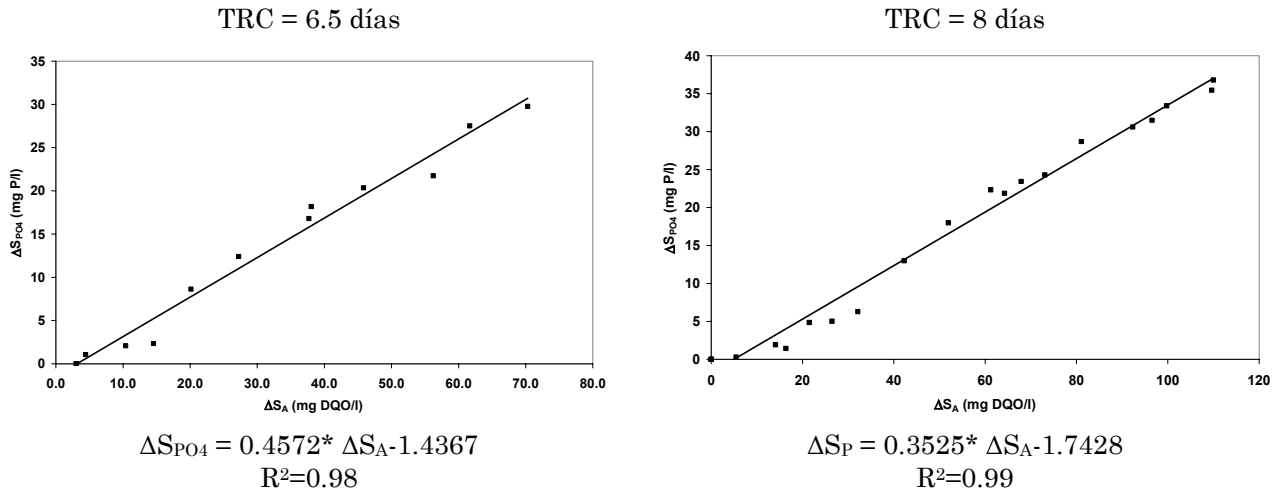


Figura 42: Fósforo liberado frente a acético consumido

Tabla 35: Parámetro Y_{PO_4}

TRC	6.5 días	8 días
Y_{PO_4} (mg P/mg DQO)	0.46	0.35

c. Parámetros cinéticos que caracterizan el comportamiento aerobio

En estas condiciones, las bacterias PAO crecen, acumulan el fósforo soluble en forma de polifosfatos (X_{PP}) y recuperan sus reservas de glucógeno obteniendo la energía necesaria de las reservas de X_{PHA} acumuladas durante la fase anaerobia.

El procedimiento experimental se lleva a cabo inmediatamente después de realizar la experiencia en condiciones anaerobias, dado que en este momento las bacterias PAO poseen la mayor reserva de X_{PHA} . El procedimiento consiste en someter a la biomasa a condiciones aerobias y registrar la OUR y la concentración de fósforo soluble. En este trabajo se introdujo en el procedimiento la determinación experimental de la concentración del polímero polihidroxicanoato, X_{PHA} . El experimento en condiciones aerobias se realiza en forma simultánea con el análisis en condiciones anóxicas, para obtener el factor de reducción de la desnitrificación. De esta manera se aprovecha la información experimental y se minimiza el tiempo y esfuerzo necesarios para realizar la metodología de calibración.

1- Medición de X_{PHA}

La cuantificación de la concentración de X_{PHA} en el fango biológico se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.3. El análisis por cromatografía gaseosa se realizó por triplicado, tanto los estándares externos como las muestras incógnitas. Con los valores obtenidos se procedió a calcular el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Este último permite eliminar la dimensionalidad de las variables y tiene en cuenta la proporción existente entre la media y la desviación estándar de una muestra.

En la Figura 43 se muestran las rectas de calibrado obtenidas para los compuestos PHB y PHV en los TRC de 6.5 y 8 días, las cuales presentan un buen ajuste. Cada valor representa una media de tres lecturas. El coeficiente de variación obtenido ha sido menor al 3% con lo cual se considera que la dispersión es mínima y que el número de réplicas realizadas es adecuado. Cada muestra incógnita también fue analizada por triplicado obteniéndose un coeficiente de variación inferior al 3% en cada una de ellas.

En la Figura 44 se presenta un cromatograma en el cual se observa la intensidad de la señal respecto al tiempo. Al inicio del mismo aparecen varias señales debido a la presencia principalmente de cloroformo y de una pequeña concentración de metanol que no se ha separado adecuadamente en la fase acuosa. Las señales provenientes del metil ester del ácido hidróxibutírico y del ácido hidroxivalérico se observan transcurridos 6.93 minutos y 7.86 minutos, respectivamente, desde la inyección de la muestra. La señal proveniente del patrón interno se observa luego de 8.65 minutos.

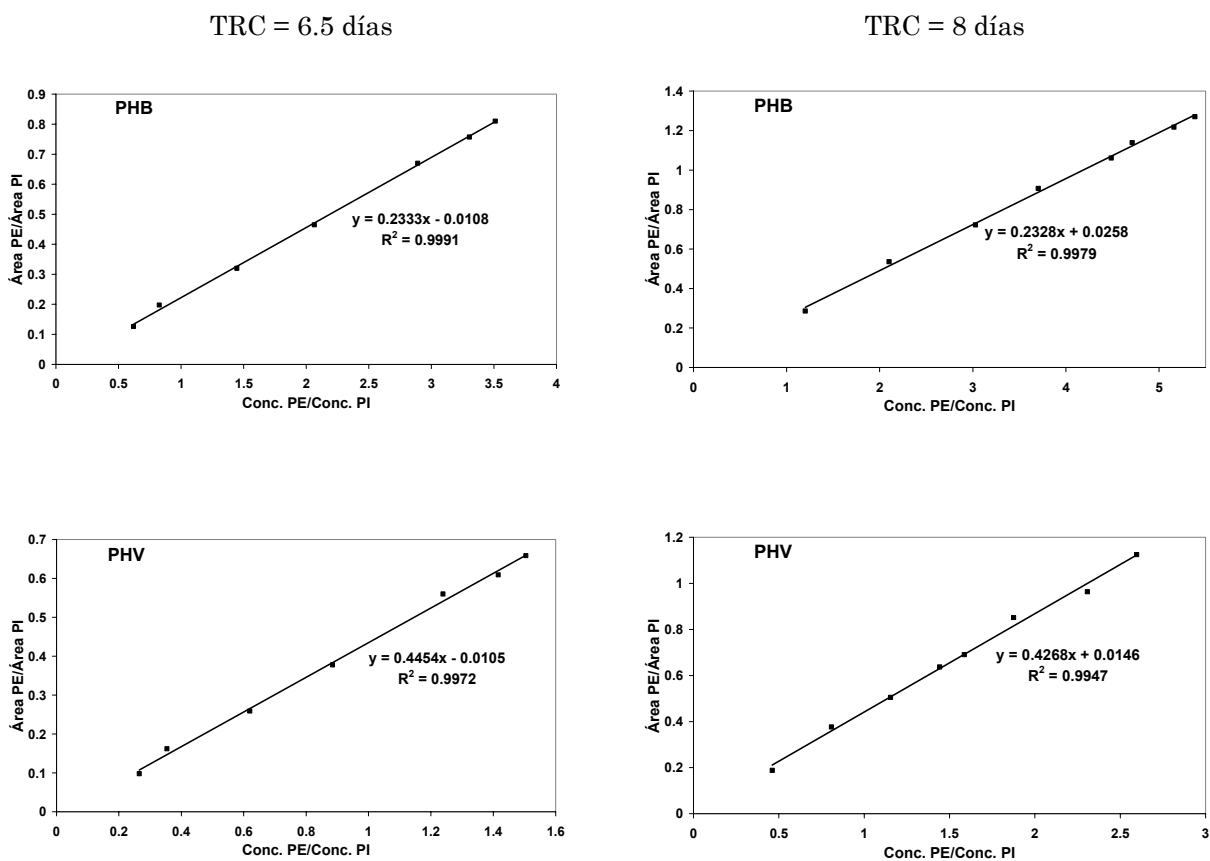


Figura 43: Curvas de calibrados de PHB y PHV. PE: Patrón Externo. PI: Patrón Interno.

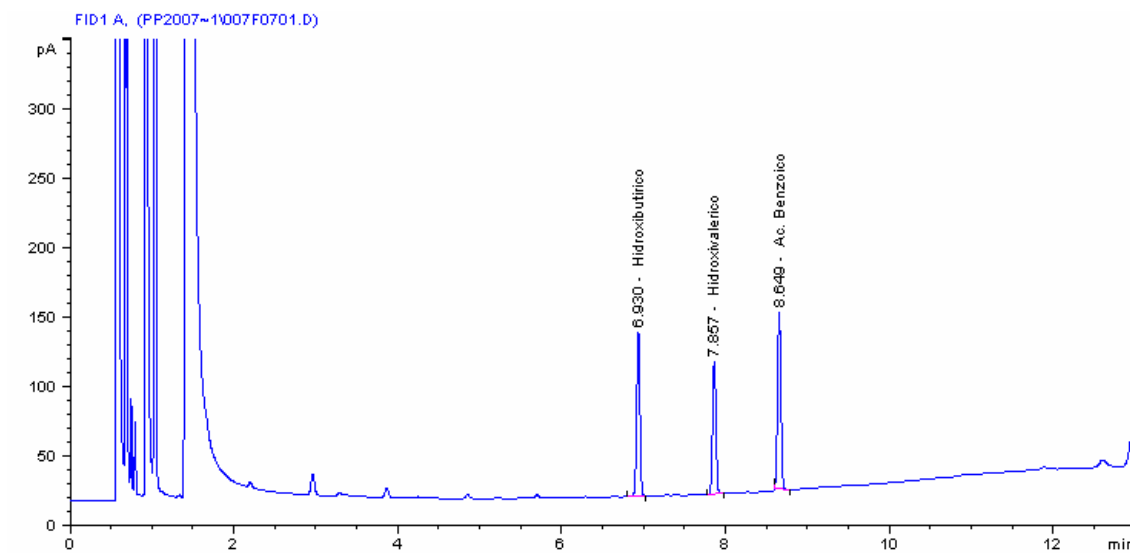


Figura 44: Cromatograma.

En la Figura 45 se muestra la evolución de las concentraciones de PHB, PHV y X_{PHA} en los ensayos de calibración *off-line* de las bacterias PAO en condiciones aerobias. El polímero X_{PHA} se encuentra principalmente en forma de PHB. El influente que alimenta a la planta piloto contiene como fuente principal de AGV al ácido acético. Este compuesto genera una mayor producción de PHB respecto a PHV cuando es consumido por las bacterias PAO (Pijuan y col., 2004). Se observa que la concentración del polímero PHV presenta una menor variación durante el ensayo respecto a la variación del polímero PHB.

El contenido del polímero X_{PHA} resulta de sumar la concentración de PHB y PHV. Es posible observar en la Figura 45 que el contenido de X_{PHA} tiende a un valor mínimo al final de cada experimento. Esto puede deberse a la necesidad biológica de mantener una reserva para suplir los requisitos energéticos del mantenimiento celular.

De acuerdo a los resultados obtenidos la concentración del polímero X_{PHA} describe un comportamiento diferente al propuesto por el modelo BNRM1. El modelo considera que la velocidad de los procesos de las bacterias PAO en condiciones aerobias está controlada por la siguiente función “switch” de semisaturación:

$$\frac{X_{PHA}}{K_{PHA} + X_{PHA}}$$

El modelo BNRM1 predice el consumo total de las reservas de X_{PHA} en la etapa aerobia y por lo tanto, la velocidad de consumo de oxígeno y la acumulación de fósforo soluble se detiene cuando la reserva de X_{PHA} en el fango biológico es nula. Sin embargo, se ha observado que las bacterias no agotan este polímero, una pequeña proporción del mismo permanece sin consumir.

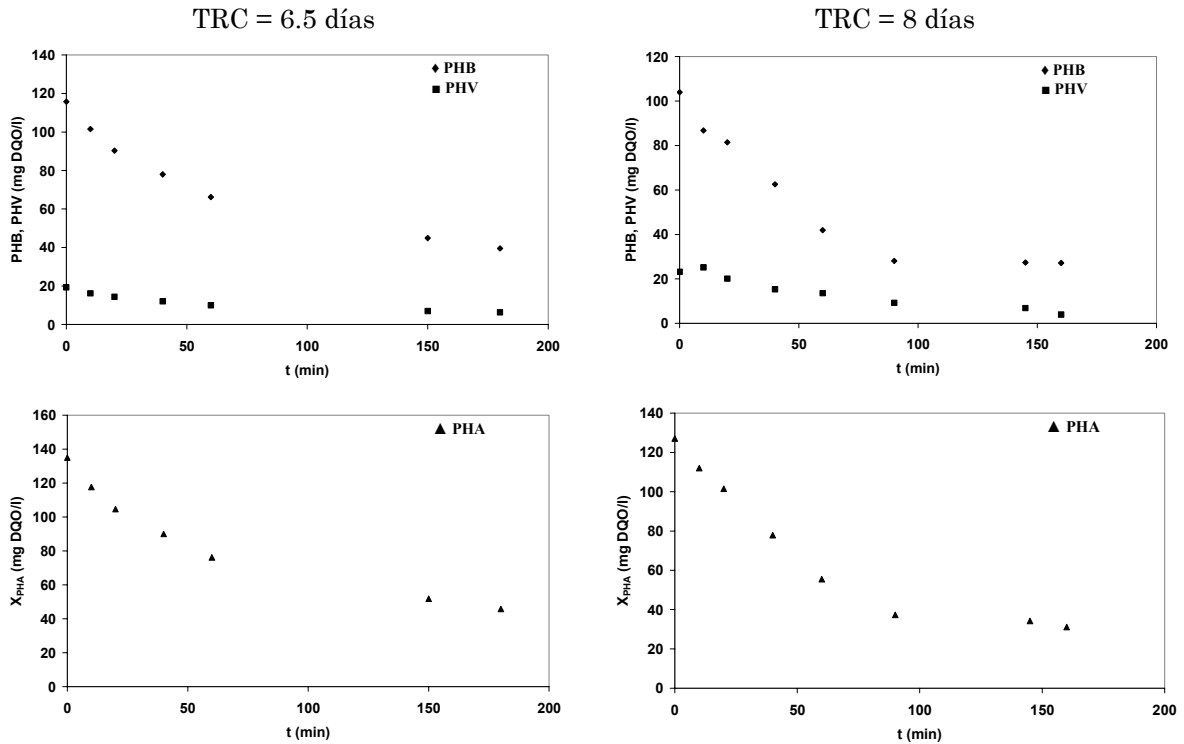


Figura 45: Concentración de X_{PHA}, PHB y PHV en los ensayos de calibración de las bacterias PAO en condiciones aerobias.

Si bien para una correcta representación de la curva de X_{PHA} se debería considerar una concentración mínima remanente, en este trabajo de investigación se pretende calibrar el modelo BNRM1. Por esta razón, únicamente se tendrá en cuenta la parte inicial de la curva de X_{PHA} en la cual se produce la mayor disminución del polímero en el ensayo aerobio. En el procedimiento de calibración de las bacterias PAO aerobias se desestimaré el conjunto de datos que describe un comportamiento estable del polímero X_{PHA}.

2- Determinación de los parámetros cinéticos

El modelo BNRM1 asume que las bacterias PAO utilizan una parte del oxígeno consumido para generar biomasa y otra para recuperar las reservas de X_{PP}. La velocidad de acumulación de fósforo viene dada por:

$$\rho_1 = q_{PP} \frac{X_{PHA}}{(K_{PHA} X_{PAO} + X_{PHA})} \frac{(K_{MAX} X_{PAO} - X_{PP})}{(K_{IPP} X_{PAO} + K_{MAX} X_{PAO} - X_{PP})} X_{PAO} \quad \text{Ec. 44}$$

y la velocidad a la cual se produce el crecimiento bacteriano viene descrita por la siguiente ecuación:

$$\rho_2 = \mu_{\text{PAO}} \frac{X_{\text{PHA}}}{K_{\text{PHA}} X_{\text{PAO}} + X_{\text{PHA}}} X_{\text{PAO}} \quad \text{Ec. 45}$$

Estas dos ecuaciones permiten describir la velocidad de utilización de X_{PHA} y el consumo de oxígeno en un reactor discontinuo de tanque agitado.

Velocidad de utilización de X_{PHA} :

$$\frac{dX_{\text{PHA}}}{dt} = -Y_{\text{PHA}} \rho_1 - \frac{1}{Y_{\text{PAO}}} \rho_2 \quad \text{Ec. 46}$$

Consumo de oxígeno:

$$\frac{dS_{\text{O}_2 \text{ crecimiento}}}{dt} = -\left(1 - \frac{1}{Y_{\text{PAO}}}\right) \rho_2 \quad \text{Ec. 47}$$

$$\frac{dS_{\text{O}_2 \text{ almacenamiento}}}{dt} = Y_{\text{PHA}} \rho_1 \quad \text{Ec. 48}$$

De esta manera el consumo total de oxígeno es:

$$\frac{dS_{\text{O}_2 \text{ registrado}}}{dt} = \frac{dS_{\text{O}_2 \text{ crecimiento}}}{dt} + \frac{dS_{\text{O}_2 \text{ almacenamiento}}}{dt} \quad \text{Ec. 49}$$

El rendimiento Y_{PHA} , establece la cantidad de X_{PHA} utilizado por unidad de fósforo acumulado y coincide con la proporción de oxígeno consumido por unidad de fósforo acumulado. El valor que se ha empleado para este parámetro es el propuesto por el modelo BNRM1, $Y_{\text{PHA}} = 0.2 \text{ mg DQO/mg P}$.

La metodología empleada para identificar los parámetros es similar a la aplicada en los ensayos anteriores. Se realiza un ajuste de los parámetros mediante la minimización de la suma del error cuadrático entre los datos experimentales de la OUR, el fósforo soluble S_{PO_4} y el polímero X_{PHA} y las ecuaciones del modelo que describen el comportamiento de estas variables

(Ec. 44, Ec. 46 y Ec. 49). En la Figura 46 se muestra el ajuste realizado a los datos experimentales del ensayo aerobio. Se observa que el modelo representa en forma adecuada el comportamiento experimental de las bacterias PAO en condiciones aerobias.

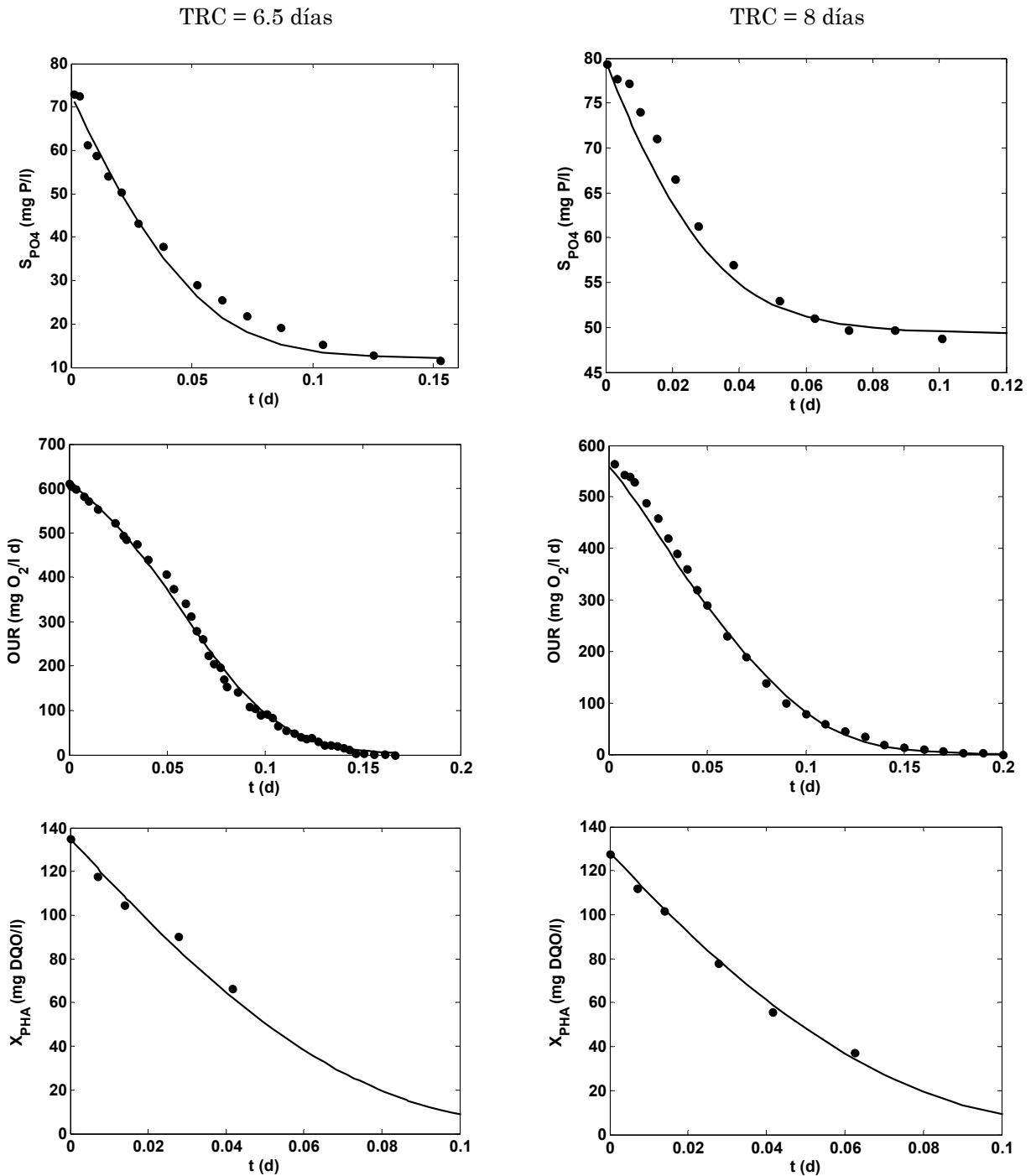


Figura 46: Comportamiento aerobio de las bacterias PAO. (●) Datos experimentales, (-) ajuste del modelo.

En la Tabla 36 se exponen los parámetros calibrados en este ensayo. Si bien se ha obtenido el mismo valor del rendimiento Y_{PAO} , el resto de parámetros muestra un ligero incremento entre el TRC de 6.5 días y el de 8 días.

Tabla 36: Parámetros cinéticos de las bacterias PAO en condiciones aerobias.

TRC	6.5 días	8 días
Y_{PAO} (mg DQO/mg DQO)	0.79	0.79
$\mu_{PAO} X_{PAO}$ (mg DQO/l d)	1836.07	1890.00
$K_{PHA} X_{PAO}$ (mg DQO/l)	47.26	49.56
$q_{PP} X_{PAO}$ (mg P/l d)	2067.20	2100.00
$K_{IPP} X_{PAO}$ (mg P/l)	17.54	18.06
$K_{MAX} X_{PAO}$ (mg P/l)	224.40	228.20

4.3.1.1.4 Tratamiento global de la información

Se observa que con la metodología seguida es posible obtener los parámetros estequiométricos de cada tipo de bacteria y los parámetros cinéticos asociados a la concentración de biomasa. Un tratamiento global de la información permite determinar las velocidades de crecimiento específicas y las de muerte celular. Para realizar dicho trabajo se asume que el consumo de oxígeno se debe exclusivamente al consumo de sustrato. Este proviene del agua residual (incluidas las reservas intracelulares) y de la lisis de los microorganismos (Penya-Roja y col., 2002).

La ecuación siguiente expresa el consumo de oxígeno exógeno:

$$OUR_{\text{exógena}} = \frac{1 - Y_H}{Y_H} \mu_H \frac{S_F}{S_F + K_F} X_H + \frac{4.57 - Y_{AUT}}{Y_{AUT}} \mu_{AUT} \frac{S_{NH4}}{S_{NH4} + K_{NH4}} X_{AUT} + \left(\left(\frac{1 - Y_{PAO}}{Y_{PAO}} \mu_{PAO} + Y_{PHA} q_{PP} \frac{K_{MAX} - X_{PP}/X_{PAO}}{K_{IPP} + K_{MAX} - X_{PP}/X_{PAO}} \right) \frac{X_{PHA}/X_{PAO}}{K_{PHA} + X_{PHA}/X_{PAO}} \right) X_{PAO} \quad \text{Ec. 50}$$

Si en un sistema existen aceptores de electrones y la biomasa está en estado estacionario, se asume que la muerte de los microorganismos y posterior degradación de los mismos se produce en forma inmediata, sin que se produzca ninguna variación de la concentración del sustrato presente. La

técnica de calibración permite hacer uso de esta teoría ya que los cambios que se pueden producir en la biomasa son insignificantes dado el pequeño intervalo de tiempo que se necesita para hacer cada uno de los ensayos de la calibración.

Al considerar que todos los microorganismos muertos se convierten inmediatamente en sustrato, la velocidad de consumo de oxígeno endógeno puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$OUR_{\text{endógena}} = (b_H X_H + b_{AUT} X_{AUT} + b_{PAO} X_{PAO}) (1-f_{XI})(1-Y_H) \quad \text{Ec. 51}$$

El valor del parámetro f_{XI} (fracción de DQO inerte generada por la lisis de la biomasa) se ha considerado 0.1, valor propuesto por el modelo BNRM1. Además debe considerarse que la suma de las especies particuladas debe ser igual a la DQO total del fango endógeno, la cual viene dada por la siguiente expresión:

$$X_{\text{Tcalculada}} = X_H (1 + f_{XI} TRC b_H) + X_{AUT} (1 + f_{XI} TRC b_{AUT}) + X_{PAO} (1 + f_{XI} TRC b_{PAO}) + X_{\text{Inf}} \frac{TRC}{HRT} \quad \text{Ec. 52}$$

Con el tratamiento global de la información descrito es posible identificar los valores de estos parámetros cinéticos y las diferentes fracciones de biomasa: μ_H , b_H , X_H , μ_{AUT} , b_{AUT} , X_{AUT} , μ_{PAO} , b_{PAO} , X_{PAO} , q_{PP} , K_{MAX} , K_{IPP} , K_{PHA} , Y_{PAO} y q_{PHA} . La rutina de cálculo empleada en esta tesis se basa en el procedimiento propuesto por García-Usach (2002), con algunas modificaciones. A continuación se detalla el algoritmo empleado:

- 1- El intervalo de variación de la concentración de biomasa activa en el sistema está dado por:

$$0 < X_{BIOMASA} < (DQO_{\text{FANGO}} - X_I TRC/TRH), \quad \text{Ec. 53}$$

con $X_{BIOMASA} = X_{AUT} + X_H + X_{PAO}$.

- 2- Cálculo del límite máximo de la concentración de X_{PAO} , para lo cual se

debe calcular el valor mínimo de X_H y el de X_{AUT} :

$$X_{H\text{ MIN}} = \tilde{\mu}_{H\text{ MIN}} \frac{Y_{H\text{ MIN}}}{(1 - Y_{H\text{ MIN}})\mu_{H\text{ MAX}}} \quad \text{Ec. 54}$$

$\tilde{\mu}_{H\text{ MIN}}$ es el parámetro cinético obtenido en el procedimiento de calibración *off-line* de las bacterias heterótrofas, MIN: indica mínimo. Este corresponde al valor del parámetro calibrado menos una desviación estándar, el cual se obtiene del algoritmo de minimización del error. $\mu_{H\text{ MAX}}$ es el valor máximo del intervalo de variación considerado para μ_H . $Y_{H\text{ MIN}}$ es el límite mínimo de variación de Y_H , el cual debido al error experimental del método se considera que es un 10% menor a Y_H . De la misma forma se ha procedido para obtener

$$X_{AUT\text{ MIN}}: \quad X_{AUT\text{ MIN}} = \tilde{\mu}_{AUT\text{ MIN}} \frac{Y_{AUT}}{(4.57 - Y_{AUT})\mu_{AUT\text{ MAX}}} \quad \text{Ec. 55}$$

De esta manera X_{PAOMAX} se obtiene considerando $X_{PAOMAX} = X_{BIOMASA} - X_{H\text{ MIN}} - X_{AUT\text{ MIN}}$.

- 3- Considerar un rango de variación en los siguientes parámetros el cual se ha determinado a partir de datos publicados en la bibliografía y de los valores propuestos por el modelo BNRM1: μ_H , K_F , b_H , μ_{AUT} , b_{AUT} , K_{NH_4} , μ_{PAO} , b_{PAO} , q_{PP} , K_{MAX} , K_{IPP} , Y_{PAO} , K_{PHA} , q_{PHA} y K_A . Se consideran además los intervalos de variación de $\tilde{\mu}_H$ y $\tilde{\mu}_{AUT}$, intervalos obtenidos del procedimiento de calibración *off-line*, de las bacterias heterótrofas y autótrofas, respectivamente, y el intervalo de variación de X_{PAO} (0 - X_{PAOMAX}) calculado en el punto 2. De esta manera se tiene un conjunto de 18 parámetros.
- 4- Se pretende encontrar un conjunto de valores de estos parámetros que permitan obtener un mínimo global en el intervalo de variación de los mismos. Para esto se ha considerado apropiada la técnica de muestreo hipercubo latino, el cual genera un muestreo aleatorio y uniforme a lo largo de cada dimensión. Para la implementación de

este algoritmo se empleó la función lhsdesign.m de MATLAB 7.1. Las etapas seguidas se mencionan a continuación:

- a- Se divide el intervalo de variación de cada uno de los 18 parámetros en N partes iguales formándose una malla de N*18 hipercubos. Se eligen aleatoriamente N hipercubos con el requisito de que para cada subintervalo de cada parámetro hay un único hipercubo seleccionado. Por último, en cada hipercubo se elige aleatoriamente un punto en él. De esta manera el algoritmo genera N muestras, cada una de las cuales contiene un valor de cada uno de los 18 parámetros. Este algoritmo se puede repetir varias veces obteniendo un conjunto M de muestras. Por ejemplo, si se divide el intervalo de variación de cada parámetro en 100 partes iguales y se repite el algoritmo 1000 veces se genera un conjunto M=100*1000 de muestras (100000). Este muestreo aleatorio permite reducir el conjunto de valores de 100¹⁸ a 100000 las cuales están uniformemente distribuidas en todo el espacio muestral.
- b- Del punto a) se obtiene un conjunto M de muestras i: μ_{Hi} , K_{Fi} , b_{Hi} , μ_{AUTi} , b_{AUTi} , K_{NH4i} , μ_{PAOi} , b_{PAOi} , q_{PPI} , K_{MAXi} , K_{IPPI} , Y_{PAOi} , K_{PHAi} , q_{PHAi} , K_{Ai} , $\tilde{\mu}_{Hi}$ y $\tilde{\mu}_{AUTi}$ y $X_{PAO i}$ con $i=1..M$. Con cada una de estas muestras se procede de la siguiente manera: se calcula X_{Hi} a partir de los datos de la muestra i, empleando la siguiente ecuación:

$$X_{Hi} = \tilde{\mu}_{Hi} \frac{Y_H}{(1 - Y_H)\mu_{Hi}} \tag{Ec. 56}$$

X_{AUTi} se obtiene con la siguiente ecuación:

$$X_{AUTi} = \tilde{\mu}_{ATi} \frac{Y_{AUT}}{(4.57 - Y_{AUT})\mu_{AUTi}} \tag{Ec. 57}$$

Se calcula el error entre los datos experimentales y las Ec. 50,

Ec. 51 y Ec. 52, incorporando además en la función de minimización el error entre los parámetros obtenidos del procedimiento de calibración *off-line* y los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la muestra *i*.

- c- Del conjunto *M* de errores obtenidos se calcula el mínimo. La muestra *i* que da el mínimo error se emplea como condición inicial para realizar un procedimiento de minimización con la función `FMINCON.m` y de esta manera localizar el mínimo global.

Para la implementación de este algoritmo se consideró adecuado dividir el intervalo de variación de los parámetros en 20 partes, y repetir el procedimiento 1000 veces, obteniéndose un conjunto de muestras $M=20000$. Los parámetros obtenidos con este procedimiento se muestran junto con el resto de parámetros calibrados en la Tabla 44.

4.3.1.1.5 Factores de eficacia en la desnitrificación

Las bacterias PAO y las heterótrofas son capaces de realizar sus funciones vitales en condiciones anóxicas, es decir empleando como aceptor final de electrones el ión NO_3^- , el cual se transforma en N_2 . Sin embargo, este proceso presenta una velocidad menor respecto a las mismas funciones realizadas en condiciones aerobias. Además, sólo una parte de la población bacteriana puede llevar a cabo estos procesos en condiciones anóxicas. Por esta razón se emplea un factor de eficacia para representar la pérdida de velocidad del proceso. A continuación se detalla el procedimiento de cálculo del factor de eficacia para las bacterias PAO (η_{PAO} y η_{PP}) y el correspondiente a las bacterias heterótrofas (η_{H}).

a. Factor η_{PAO} y η_{PP}

El parámetro η_{PP} representa la reducción en eficacia del proceso de acumulación de fósforo que realizan las bacterias PAO en condiciones

anóxicas respecto al mismo proceso en condiciones aerobias. Para obtener dicho factor se divide el fango en dos partes y se somete una porción a condiciones anóxicas y la otra a condiciones aerobias. Se sigue la evolución de la concentración del fósforo soluble, S_{PO_4} , en los dos y se determina la velocidad inicial de consumo de nitratos y oxígeno. En este experimento se emplea el fango biológico utilizado en condiciones anaerobias. Las bacterias PAO de este licor mezcla han liberado todo el fósforo y poseen una gran reserva de X_{PHA} . La velocidad inicial de consumo de oxígeno se obtiene de los datos de OUR recogidos en la sección 4.3.1.1.3.c.

La disminución de la concentración de fósforo en las dos condiciones de trabajo se muestra en la Figura 47. De ambas curvas se calcula la velocidad inicial de consumo de fósforo, las cuales se muestran en la Tabla 37.

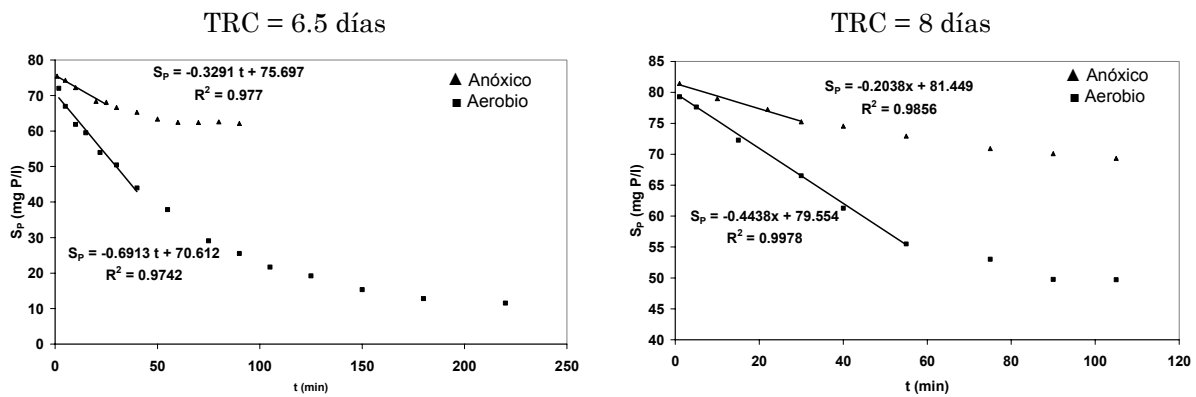


Figura 47: Concentración de S_p en el reactor anóxico y aerobio.

Tabla 37: Velocidad inicial de consumo de fósforo en condiciones anóxicas y aerobias.

TRC	6.5 días	8 días
$(-dS_{PO_4}/dt)_{anóxica}$ (mg P/l min)	0.3291	0.2038
$(-dS_{PO_4}/dt)_{aerobia}$ (mg P/l min)	0.6913	0.4438

Para expresar estas velocidades en unidades de oxígeno, se multiplican cada una de ellas por el rendimiento $Y_{PHA}=0.20$ mg O/mgP, obteniéndose:

Tabla 38: Velocidad inicial de consumo de fósforo anóxica y aerobia en unidades de oxígeno.

TRC	6.5 días	8 días
$(-dS_{PO_4}/dt)_{anóxica}$ (mg O/l min)	0.0658	0.0408
$(-dS_{PO_4}/dt)_{aerobia}$ (mg O/l min)	0.1383	0.0888

El parámetro η_{PP} se obtiene del cociente entre la velocidad en condiciones anóxicas respecto a las aerobias, resultando los siguientes valores:

Tabla 39: Parámetro η_{PP}

TRC	6.5 días	8 días
η_{PP}	0.48	0.46

El parámetro η_{PAO} representa la eficacia del crecimiento en condiciones anóxicas respecto al que se produce en condiciones aerobias. Para su determinación es necesario conocer las velocidades iniciales del consumo de S_{NO_3} y de oxígeno. Este último valor se obtiene del ensayo aerobio de las bacterias PAO. En la Figura 48 se muestra la evolución de la concentración de nitratos, S_{NO_3} , en unidades de oxígeno, para lo cual se multiplica cada valor de S_{NO_3} por el factor 2.86 mgO/mgN. De cada gráfica se obtiene la velocidad de consumo de S_{NO_3} inicial en unidades de oxígeno, lo cual se muestra en la Tabla 40.

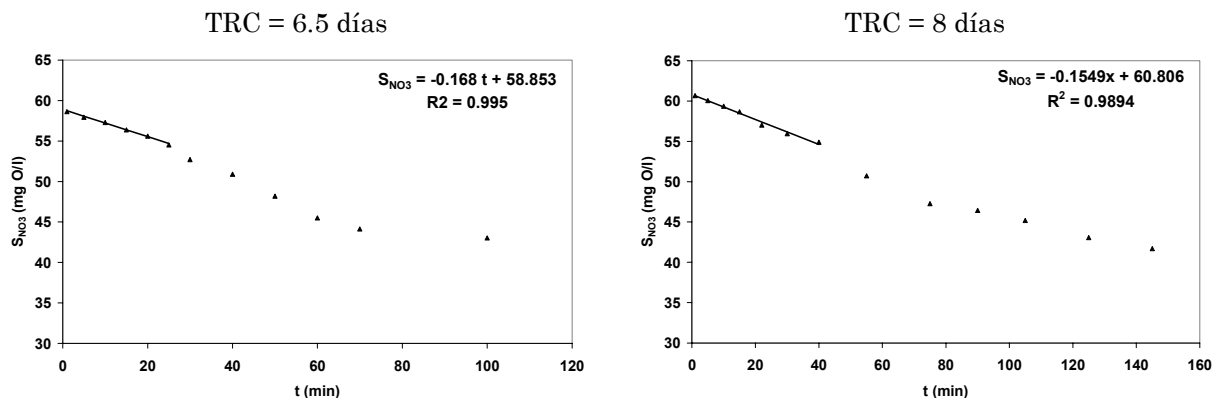
**Figura 48: Evolución de S_{NO_3} en el proceso de desnitrificación de las bacterias PAO.**

Tabla 40: Velocidad inicial total de consumo de nitratos y oxígeno.

TRC	6.5 días	8 días
$(-dS_{NO_3}/dt)_{total}$ (mg O/l min)	0.1683	0.1549
$(-dS_O/dt)_{total}$ (mg O/l min)	0.5238	0.4555

El parámetro η_{PAO} se calcula de la relación entre el consumo de nitrato y oxígeno debido únicamente al crecimiento:

Tabla 41: Parámetro η_{PAO}

TRC	6.5 días	8 días
η_{PAO}	$(0.1683 - 0.0658)/(0.5238 - 0.1383) = 0.27$	$(0.1549 - 0.0408)/(0.4555 - 0.0888) = 0.31$

b. Factor η_H de las bacterias heterótrofas

Al igual que las bacterias PAO, este parámetro se obtiene sometiendo el fango biológico a dos condiciones de trabajo: aerobias y anóxicas. Se realizan ambas experiencias en paralelo. La velocidad de consumo inicial de nitrato se obtiene ajustando a una recta los primeros puntos de la evolución de la concentración S_{NO_3} . La velocidad inicial de consumo de oxígeno se obtiene de los datos de la OUR de la determinación experimental del parámetro Y_H , puesto que el fango y el sustrato es el mismo en ambos ensayos. En la Figura 49 se observa la variación de S_{NO_3} respecto al tiempo para cada TRC analizado.

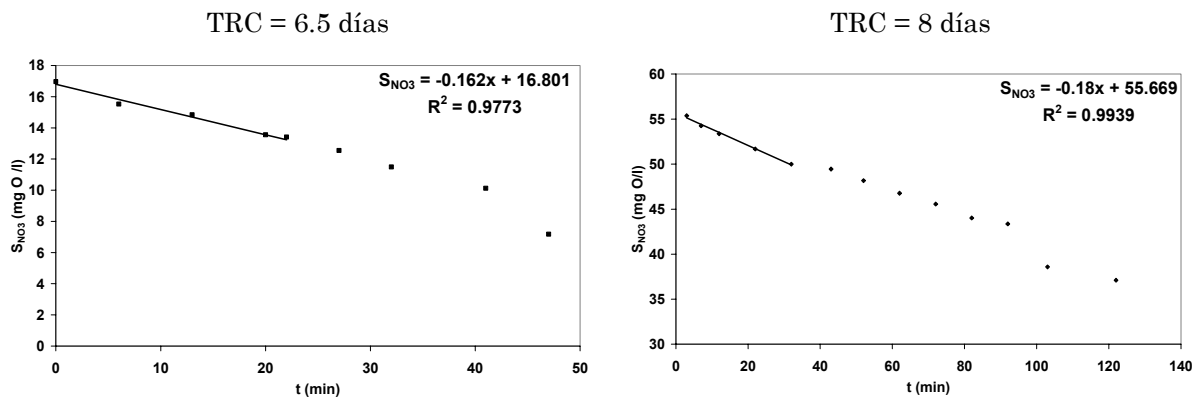


Figura 49: Evolución de S_{NO_3} respecto al tiempo.

Los valores de las velocidades iniciales se recogen en la Tabla 42.

Tabla 42: Velocidades iniciales de consumo de S_{NO_3} en el proceso de desnitrificación de las bacterias heterótrofas.

TRC	6.5 días	8 días
$(-dS_{NO_3}/dt \text{ 2.86})$ (mg O/l min)	0.1620	0.1800
$(-dS_O/dt)$ (mg O/l min)	1.2694	0.9243

El valor de η_H se obtiene de la relación entre ambas velocidades:

Tabla 43: Parámetro η_H

TRC	6.5 días	8 días
η_H	0.13	0.19

4.3.1.1.6 Resultados de la calibración del modelo BNRM1

Con la determinación de los factores de eficacia finaliza el proceso de calibración del modelo BNRM1 por medio de ensayos de laboratorio *off-line*. En la Tabla 44 se muestran los valores de todos los parámetros estequiométricos y cinéticos obtenidos.

Tabla 44: Parámetros calibrados mediante ensayos *off-line*.

	Parámetros	TRC = 6.5 días	TRC = 8 días
Bacterias Heterótrofas	Y_H (mgDQO/mgDQO)	0.61	0.58
	μ_H (d ⁻¹)	2.00	2.08
	η_H	0.13	0.19
	b_H (d ⁻¹)	0.40	0.40
	K_F (mgDQO/l)	1.30	1.10
Bacterias Autótrofas	μ_{AUT} (d ⁻¹)	1.30	1.20
	b_{AUT} (d ⁻¹)	0.20	0.20
	K_{NH_4} (mgN/l)	0.20	0.24
Bacterias PAO	Y_{PAO} (mgDQO/mgDQO)	0.79	0.79
	Y_{PO_4} (mgP/mgDQO)	0.46	0.35
	μ_{PAO} (d ⁻¹)	2.70	2.70
	q_{PHA} (mgDQO/mgDQO d ⁻¹)	3.60	3.60
	q_{PP} (mgP/mgO d ⁻¹)	3.04	3.00
	b_{PAO} (d ⁻¹)	0.20	0.20
	K_A (mg DQO/l)	1.00	1.00
	K_{PHA} (mgO/mgO)	0.070	0.071
	K_{MAX} (mgP/mgO)	0.33	0.33
	K_{IPP} (mgP/mgO)	0.026	0.026
	η_{PAO}	0.27	0.31
	η_{PP}	0.48	0.46

4.3.1.1.7 Simulación del comportamiento de la Planta Piloto

El procedimiento de simulación de la planta de aguas, empleando los parámetros calibrados mediante ensayos *off-line*, permite comprobar la calidad de los parámetros obtenidos. El comportamiento del proceso ha sido simulado empleando el programa DESASS (Ferrer y col., 2008).

DESASS (“Desing and Simulation of Activated Sludge Systems”) es un programa de simulación desarrollado por el grupo de investigación CALAGUA. Consiste en un simulador de estaciones depuradoras de aguas residuales configurado en un entorno Windows, diseñado y optimizado para: i) la investigación de los procesos de eliminación de materia orgánica y nutrientes, ii) el entrenamiento de personal, iii) propósitos educativos y iv) el diseño de una EDAR. El programa tiene implementado un algoritmo de modelación matemática basado en el modelo BNRM1.

El procedimiento consiste en introducir al simulador la configuración de la planta piloto, las características del influente y el valor de los parámetros estequiométricos y cinéticos de cada uno de los grupos de microorganismos presentes. El conjunto restante de parámetros no calibrados mediante ensayos específicos toman los valores propuestos por el modelo BNRM1, recogidos principalmente de la bibliografía. Sin embargo, en algunos casos se considera necesario un ajuste manual de estos parámetros para lograr un mejor resultado en la simulación de la planta piloto. Una vez el programa converge a una solución, se comparan los valores predichos por el modelo con los experimentales. Una gran similitud entre ambos permite asumir que se ha realizado un procedimiento adecuado de calibración de parámetros.

El esquema de la planta piloto empleado en esta etapa del trabajo ha sido el Esquema de operación 1 (ver apartado 3.1.1), y los datos de la planta se encuentran detallados en la Tabla 19 (pag. 122).

a. Caracterización del influente

Conforme a los resultados obtenidos en la sección 4.2 cada una de las fracciones de materia orgánica se determinan por el método físico-químico con un tamaño de filtro de 0.1 μm .

Las concentraciones de fósforo y ácido acético en el influente de la planta piloto se incrementan mediante la adición de una disolución. Por lo tanto el contenido de la fracción de ácidos grasos volátiles y fósforo es la suma del contenido de estos compuestos en el influente y en la disolución. En la Tabla 20 y en la Tabla 21 se detallan todas las analíticas realizadas en la caracterización exhaustiva del influente. En la Tabla 45 se recogen los valores medios de las concentraciones del influente tras la adición de la disolución.

Tabla 45: Valores medios de la caracterización del influente.

	TRC = 6.5 días	TRC = 8 días
S_F (mg DQO/l)	35	40
S_A (mg DQO/l)	131	128
S_I (mg DQO/l)	23	22
X_S (mg DQO/l)	230	173
X_I (mg DQO/l)	79	63
S_{PO_4} (mg P/l)	9.4	13.0
S_{NH_4} (mg N/l)	30.1	26.4
S_{NO_3} (mg N/l)	0.2	0.0

En el programa de simulación se introducen las características del influente de la planta de aguas recogidos en la Tabla 45, y se aplican las ecuaciones de continuidad para cada uno de los componentes siguiendo la matriz definida en la Tabla 3 (pag. 53). Para ello, es necesario conocer los factores de conversión que se calculan de los datos experimentales. Estos factores se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 46: Factores de conversión empleados en la simulación de la planta piloto.

Parámetro	Definición	Unidades	Valores	
			TRC=6.5 días	TRC=8 días
Nitrógeno				
$i_{N S_I}$	N en la fracción S_I	gN/gO	0.015	0.043
$i_{N S_F}$	N en la fracción S_F	gN/gO	0.020	0.027
$i_{N X_I}$	N en la fracción X_I	gN/gO	0.072	0.054
$i_{N X_S}$	N en la fracción X_S	gN/gO	0.023	0.009
$i_{N B_M}$	N en la biomasa	gN/gO	0.070	0.070
Fósforo				
$I_{P S_I}$	P en la fracción S_I	gP/gO	0	0
$I_{P S_F}$	P en la fracción S_F	gP/gO	0.002	0.001
$I_{P X_I}$	P en la fracción X_I	gP/gO	0.008	0.030
$I_{P X_S}$	P en la fracción X_S	gP/gO	0.007	0.010
$I_{P B_M}$	P en la biomasa	gP/gO	0.020	0.020
Carbono				
$I_{C S_I}$	C en la fracción S_I	gC/gO	0.020	0.020
$I_{C S_F}$	C en la fracción S_F	gC/gO	0.020	0.020
$I_{C X_I}$	C en la fracción X_I	gC/gO	0.020	0.020
$I_{C X_S}$	C en la fracción X_S	gC/gO	0.020	0.020
$I_{C B_M}$	C en la biomasa	gC/gO	0.020	0.020
Sólidos Suspendidos Totales				
$I_{SST X_I}$	SST en la fracción X_I	gSST/gO	0.690	0.450
$I_{SST X_S}$	SST en la fracción X_S	gSST/gO	0.580	0.590
$I_{SST B_M}$	SST en la biomasa	gSST/gO	0.465	0.475

b. Resultados de la Simulación

Los valores de los parámetros cinéticos y estequiométricos para los microorganismos presentes en el sistema empleados en la simulación de la planta piloto son los detallados en la Tabla 44.

Durante el procedimiento de simulación se observó que el contenido en DQO de los reactores predichos por el modelo, considerando el valor de la X_I de la caracterización del influente, eran notablemente superiores a los experimentales. Para lograr valores similares fue necesario disminuir el valor de la componente X_I . En el TRC de 6.5 días se empleó un valor de $X_I = 55$ mg DQO/l y en el TRC de 8 días el valor fue $X_I = 46$ mg DQO/l. El contenido de materia orgánica biodegradable se obtiene con el método de la DBO, en el cual se coloca una muestra de agua residual con una pequeña alícuota de fango y se agita permanentemente durante 20 días. Esta agitación es menos intensa que las fuerzas mecánicas que sufre el fango

cuando pasa a través de las bombas y las conducciones en la planta. Estas fuerzas mecánicas pueden degradar una parte de esa fracción X_I transformándola en materia orgánica lentamente biodegradable que será consumida por la biomasa después de la etapa de hidrólisis.

Los resultados de la simulación con el programa DESASS, para cada uno de los estudios realizados, se recogen en la Tabla 47 y Tabla 48. También se incluyen los valores experimentales obtenidos en la caracterización de todas las etapas de la planta piloto.

Tabla 47: Valores experimentales y simulados correspondientes a TRC = 6.5 días.

	Reactor Anaerobio		Reactor Anóxico		Reactor Aerobio		Efluente	
	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.
DQO _{TOTAL} (mg DQO/L)	2581	2584	3669	3664	3651	3611	58	48
DQO _{SOL} (mg DQO/L)							23	25
SST (mg SST /l)	2346	2245	3352	3322	3331	3331	23	21
SSV (mg SST /l)	1682	1654	2390	2453	2375	2463	14	16
S _{PO4} (mgP/L)	23.7	22.5	9.6	9.9	0.0	0.0	0.0	0.0
S _{NH4} (mgN/L)	17.2	16.7	9.6	9.2	< 0.1	0.1	< 0.1	0.1
S _{NO3} (mg N/L)	0.0	0.0	0.0	0.1	6.6	6.7	6.6	6.7
N _{T SOL} (mg N/L)	18.4	17.8	11.0	10.3	8.0	7.1	7.4	7.1
N _{TOT} (mg N/L)							8.5	8.7
AGV (mg DQO/L)	6.3	16.5	3.1	0.1	0	0.0	0	0.0

Tabla 48: Valores experimentales y simulados correspondientes a TRC = 8 días.

	Reactor Anaerobio		Reactor Anóxico		Reactor Aerobio		Efluente	
	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.
DQO _{TOTAL} (mg DQO/L)	2520	2520	3625	3655	3570	3607	41	53
DQO _{SOL} (mg DQO/L)							21	25
SST (mg SST /l)	2231	2226	3361	3369	3257	3380	26	26
SSV (mg SST /l)	1598	1541	2354	2340	2296	2351	14	18
S _{PO4} (mgP/L)	25.5	25.2	11.4	12.6	2.1	2.3	2.1	2.3
S _{NH4} (mgN/L)	11.6	14.6	5.1	7.6	0.2	0.0	0.2	0.0
S _{NO3} (mg N/L)	0.0	0.0	0.5	0.1	5.0	5.0	5.1	5.0
N _{T SOL} (mg N/L)	12.4	16.5	6.0	9.3	6.0	6.1	6.1	6.1
N _{TOT} (mg N/L)							8.6	7.8
AGV (mg DQO/L)	0.0	14.1	0.0	0.1	0.5	0.0	0.0	0.0

Como puede observarse en las tablas anteriores, el proceso de simulación ha permitido reproducir los valores experimentales de las distintas etapas del proceso con un buen grado de exactitud. Sin embargo, en ambos casos se observa que el valor de AGV simulado es superior al valor experimental obtenido en el reactor anaerobio, lo cual puede indicar un problema de ajuste de los parámetros no calibrados en los ensayos específicos en el laboratorio.

4.3.1.2 Análisis de Sensibilidad de los ensayos de calibración off-line

El análisis de sensibilidad permite estudiar en qué intervalo del experimento los parámetros muestran mayor influencia en la respuesta del modelo. De esta manera, el resultado del análisis puede emplearse para mejorar la identificabilidad de cada parámetro. Para esto se lleva a cabo un aumento de la frecuencia del muestreo en el intervalo del experimento donde cada parámetro presente mayor sensibilidad.

El análisis de sensibilidad se realizó en cada uno de los ensayos de calibración. A continuación se presentan los resultados de este análisis.

4.3.1.2.1 Bacterias heterótrofas

El ensayo de calibración de los parámetros cinéticos de las bacterias heterótrofas considera la relación entre la OUR exógena y la concentración de sustrato rápidamente biodegradable que describe la Ec. 41 (pag. 170). El análisis de sensibilidad que se implementa es estático puesto que el tiempo no está involucrado en el ensayo (Marsilli-Libelli y col., 2001).

El procedimiento consiste en calcular las derivadas parciales de la OUR respecto a cada parámetro que se calibra en el ensayo. Estas derivadas se emplean para el cálculo de la sensibilidad a través de la Ec. 11 (pag. 73). A continuación se muestran las ecuaciones obtenidas:

$$\frac{\partial \text{OUR}}{\partial \tilde{\mu}_H} = \frac{S_F}{K_F + S_F} \frac{\tilde{\mu}_{H\text{NOM}}}{\text{OUR}_{\text{NOM}}} \quad \text{Ec. 58}$$

con $\tilde{\mu}_H = \frac{1 - Y_H}{Y_H} \mu_H X_H$. S_F representa $(S_{\text{AN}} + S_{\text{END}})$ en el ensayo.

$$\frac{\partial \text{OUR}}{\partial K_F} = -\tilde{\mu}_H \frac{S_F}{(K_F + S_F)^2} \frac{K_{F\text{NOM}}}{\text{OUR}_{\text{NOM}}} \quad \text{Ec. 59}$$

Para el cálculo de estas ecuaciones se emplearon los valores obtenidos en el procedimiento de calibración de los parámetros. Se consideró como OUR_{NOM} el valor máximo de la OUR en el ensayo. Los valores nominales de $K_{F\text{NOM}}$ y $\tilde{\mu}_{H\text{NOM}}$ se tomaron de los parámetros calibrados en este experimento. Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 50.

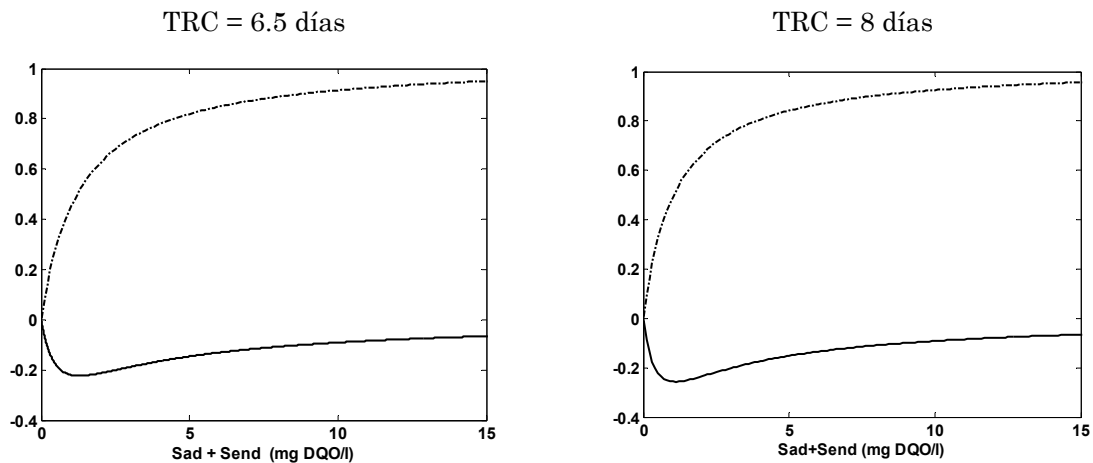


Figura 50: Sensibilidad de los parámetros $\tilde{\mu}_H$ (..) y K_F (-) frente a la concentración de sustrato.

En la Figura 50 se observa que una variación positiva del parámetro $\tilde{\mu}_H$ tiene un efecto positivo en la velocidad de consumo de oxígeno, dado que el valor de la sensibilidad es superior a cero en todo el rango de variación del sustrato. Del análisis realizado en ambos TRC se puede establecer que este parámetro tiene una mayor influencia a altas concentraciones y que por lo tanto para lograr una mejor identificación del parámetro $\tilde{\mu}_H$ se debe acentuar el muestreo en esta zona. El parámetro K_F tiene un efecto negativo respecto a la OUR. La mayor influencia de este parámetro ocurre en el

intervalo en el cual la concentración del sustrato se aproxima al valor de K_F . Por lo tanto en este intervalo debe aumentarse el muestreo para lograr una mejor identificación de la constante de semisaturación.

La sensibilidad de estos parámetros describe un comportamiento similar en ambos TRC, lo cual se debe a i) una similitud entre los parámetros de las bacterias heterótrofas obtenidos en cada edad de fango y ii) que el cálculo de la sensibilidad incorpora el valor nominal del parámetro y de la variable.

4.3.1.2.2 Bacterias autótrofas

El procedimiento empleado para el cálculo de las sensibilidades es similar al realizado en el apartado anterior. Las sensibilidades obtenidas se muestran a continuación:

$$\frac{\partial \text{OUR}}{\partial \mu_{\text{AUT}}} = \frac{S_{\text{NH}_4}}{K_{\text{NH}_4} + S_{\text{NH}_4}} \frac{\mu_{\text{AUT NOM}}}{\text{OUR}_{\text{NOM}}} \quad \text{Ec. 60}$$

$$\text{con } \mu_{\text{AUT}} = \frac{4.57 - Y_A}{Y_A} \mu_{\text{AUT}} X_{\text{AUT}}$$

$$\frac{\partial \text{OUR}}{\partial K_{\text{NH}_4}} = -\mu_{\text{AUT}} \frac{S_{\text{NH}_4}}{(K_{\text{NH}_4} + S_{\text{NH}_4})^2} \frac{K_{\text{NH}_4 \text{ NOM}}}{\text{OUR}_{\text{NOM}}} \quad \text{Ec. 61}$$

Para el cálculo de estas ecuaciones se emplearon los valores obtenidos en el procedimiento de calibración de los parámetros de las bacterias autótrofas. El valor máximo de la OUR en el ensayo se consideró como valor de la OUR_{NOM} y los valores de los parámetros calibrados en el ensayo se tomaron como $K_{\text{NH}_4 \text{ NOM}}$ y $\mu_{\text{AUT NOM}}$. En la Figura 51 se muestran las curvas de sensibilidad obtenidas para las bacterias autótrofas. El comportamiento es similar a las gráficas de la Figura 50. El parámetro μ_{AUT} presenta una zona de mayor sensibilidad a altas concentraciones de S_{NH_4} y la constante de semisaturación K_{NH_4} es más sensible cuando la concentración de S_{NH_4} se

aproxima al valor de este parámetro. En este análisis también se observa un comportamiento similar entre las curvas de ambos TRC.

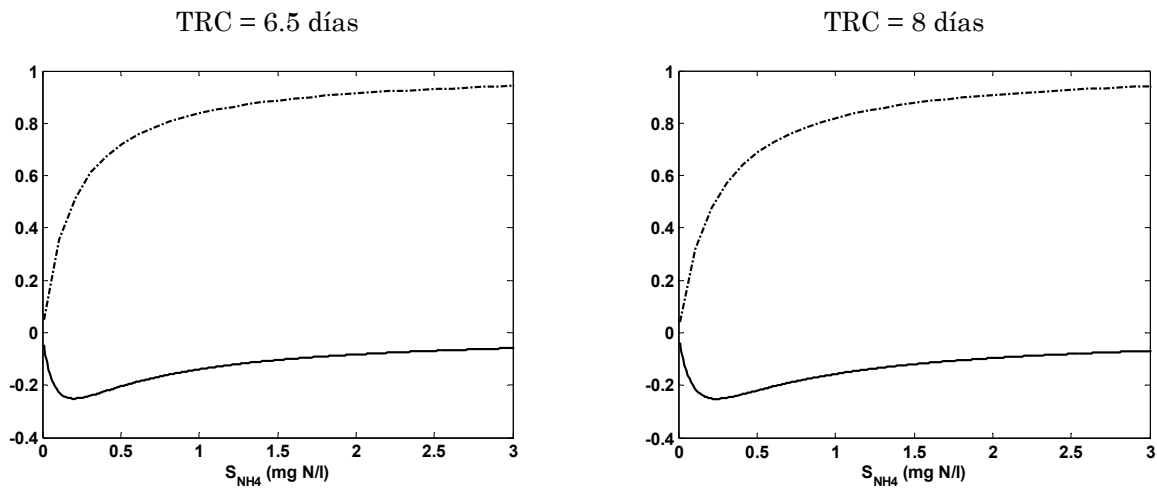


Figura 51: Sensibilidad de los parámetros $\tilde{\mu}_{AUT}$ (..) y K_{NH_4} (-) frente a la concentración de S_{NH_4} .

4.3.1.2.3 Bacterias PAO

Los ensayos de calibración de los parámetros característicos de estas bacterias están descritos por ecuaciones diferenciales dinámicas, es decir involucran el tiempo. Por esta razón, el análisis se realiza mediante el cálculo de las funciones de sensibilidad empleando la Ec. 14 (pag. 74).

a. Experimento de calibración en condiciones anaerobias

El proceso anaerobio de las bacterias PAO está representado por una ecuación diferencial. De esta manera el cálculo de la función de sensibilidad resulta relativamente sencillo. Si se considera que:

$$\frac{dS_A}{dt} = f(S_A, K_A, q_{PHA} X_{PAO}) = -q_{PHA} X_{PAO} \frac{S_A}{S_A + K_A} \quad \text{Ec. 62}$$

Empleando la Ec. 14 se tiene:

$$\frac{dS_{q_{PHA}X_{PAO}}^{S_A}(t)}{dt} = \left. \frac{\partial f}{\partial S_A} \right|_{S_{ANOM}} S_{q_{PHA}X_{PAO}}^{S_A}(t) + \frac{\partial f}{\partial q_{PHA}X_{PAO}} \quad \text{Ec. 63}$$

$$\frac{dS_{K_A}^{S_A}(t)}{dt} = \left. \frac{\partial f}{\partial S_A} \right|_{S_{ANOM}} S_{K_A}^{S_A}(t) + \frac{\partial f}{\partial K_A} \quad \text{Ec. 64}$$

Las derivadas parciales de f respecto a S_A , $q_{PHA}X_{PAO}$ y K_A se reemplazan en las ecuaciones anteriores para obtener finalmente las funciones de sensibilidad. El último paso consiste en afectar a estas funciones por los valores nominales de la variable y los parámetros. En este caso se consideró S_{ANOM} el valor máximo de S_A en el ensayo. K_{ANOM} y $q_{PHA}X_{PAO\ NOM}$ se tomaron los valores calibrados en el ensayo. Las ecuaciones diferenciales de las funciones de sensibilidad se resolvieron con la función ODE45.m de Matlab considerando que $S_{q_{PHA}X_{PAO}}^{S_A}(0) = 0$ y $S_{K_A}^{S_A}(0) = 0$.

Las funciones de sensibilidad del ensayo anaerobio se muestran en la Figura 52. El parámetro K_A tiene un efecto positivo en la variable S_A , mientras que el parámetro $q_{PHA}X_{PAO}$ describe un efecto negativo. La constante de semisaturación es más sensible en la zona donde la concentración de S_A se hace mínima en el ensayo, es decir donde S_A tiende al valor de la constante K_A . Esto indica la necesidad de realizar un muestreo exhaustivo en el período final del ensayo para lograr una identificación adecuada de K_A . El parámetro $q_{PHA}X_{PAO}$, que determina la velocidad de toma de ácido acético, es más sensible en la zona intermedia del ensayo. En este período se produce la mayor velocidad de consumo de acético. De los dos parámetros, $q_{PHA}X_{PAO}$ es notablemente más sensible puesto que, su función de sensibilidad alcanza un mayor valor absoluto que la función de sensibilidad del parámetro K_A .

En este análisis de sensibilidad, de la misma forma que en el análisis realizado a los ensayos de Monod de las bacterias autótrofas y heterótrofas, también se observa un comportamiento similar entre las curvas de ambos TRC.

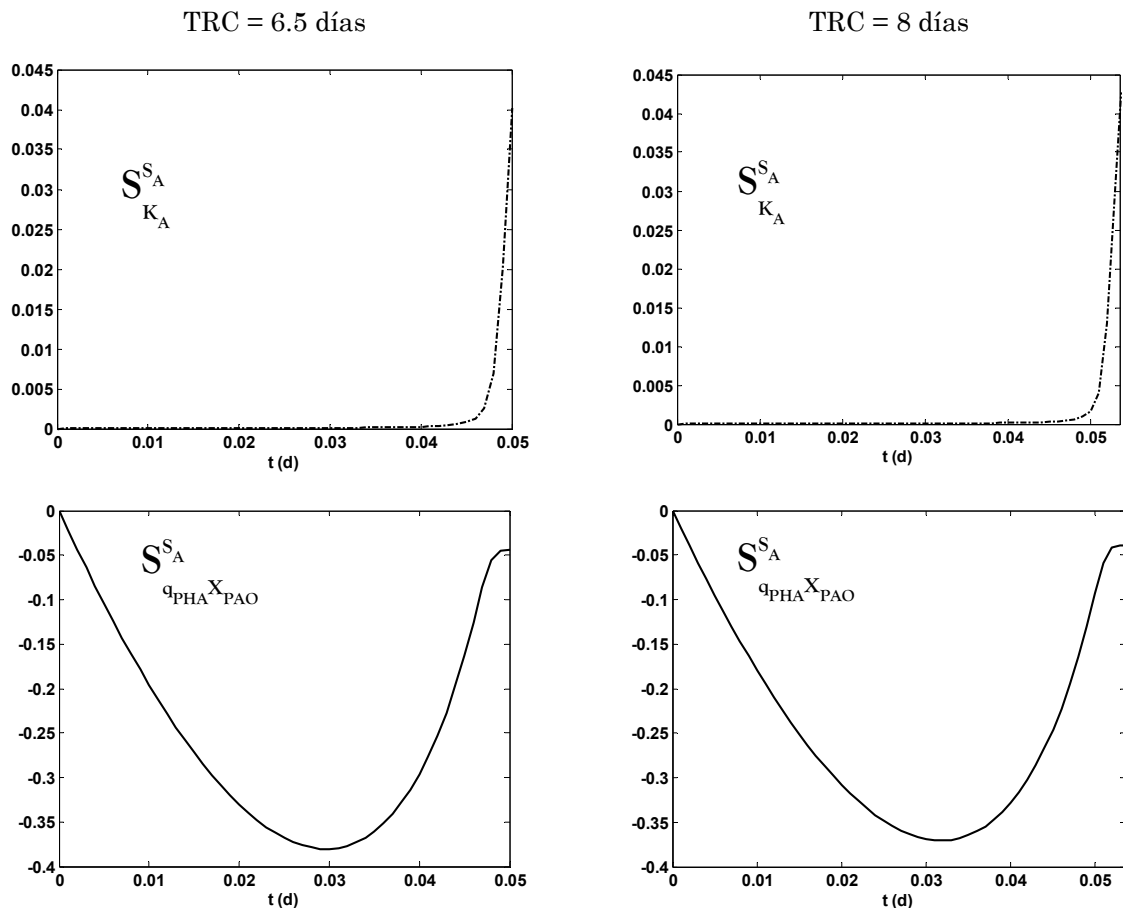


Figura 52: Funciones de sensibilidad de las bacterias PAO en condiciones anaerobias.

En el ensayo de calibración en condiciones anaerobias se determina además el parámetro Y_{PO_4} que representa la proporción de fósforo liberado por unidad de DQO consumida de ácido acético. Este parámetro se calcula mediante el ajuste lineal del incremento de la concentración de fósforo soluble en condiciones anaerobias frente al consumo de ácido acético. Los valores que tienen un gran peso en el cálculo de este parámetro son los correspondientes al intervalo del experimento donde se produce una mayor velocidad de consumo de ácido acético e incremento del fósforo liberado. En este intervalo el parámetro $q_{PHA}X_{PAO}$ muestra mayor sensibilidad y conviene elevar la frecuencia del muestreo para lograr una mejor identificabilidad del parámetro Y_{PO_4} .

b. Experimento de calibración en condiciones aerobias

El proceso biológico de las bacterias PAO en condiciones aerobias está descrito por tres ecuaciones diferenciales (Ec. 44, Ec. 46 y Ec. 49, pag. 179 y 180) que involucran 7 parámetros. La Ec. 14 (pag. 74) y la Ec. 15 (pag. 75) se han implementado para calcular las funciones de sensibilidad.

Se considera la siguiente notación:

$$\begin{aligned} \frac{dX_{PHA}}{dt} &= f_1(X_{PHA}, X_{PP}, S_{O_2}, \mu_{PAO} X_{PAO}, q_{PP} X_{PAO}, K_{MAX} X_{PAO}, K_{IPP} X_{PAO}, K_{PHA} X_{PAO}, Y_{PAO}, Y_{PHA}) \\ \frac{dX_{PP}}{dt} &= f_2(X_{PHA}, X_{PP}, S_{O_2}, \mu_{PAO} X_{PAO}, q_{PP} X_{PAO}, K_{MAX} X_{PAO}, K_{IPP} X_{PAO}, K_{PHA} X_{PAO}, Y_{PAO}, Y_{PHA}) \\ \frac{dS_{O_2}}{dt} &= f_3(X_{PHA}, X_{PP}, S_{O_2}, \mu_{PAO} X_{PAO}, q_{PP} X_{PAO}, K_{MAX} X_{PAO}, K_{IPP} X_{PAO}, K_{PHA} X_{PAO}, Y_{PAO}, Y_{PHA}) \end{aligned} \quad \text{Ec. 65}$$

A continuación se muestra el sistema de ecuaciones de sensibilidad para el parámetro $\mu_{PAO} X_{PAO}$:

$$\begin{bmatrix} \frac{dS_{PHA}^{X_{PHA}}}{\mu_{PAO} X_{PAO} dt}(t) \\ \frac{dS_{PP}^{X_{PP}}}{\mu_{PAO} X_{PAO} dt}(t) \\ \frac{dS_{O_2}^{S_{O_2}}}{\mu_{PAO} X_{PAO} dt}(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial X_{PHA}} & \frac{\partial f_1}{\partial X_{PP}} & \frac{\partial f_1}{\partial S_{O_2}} \\ \frac{\partial f_2}{\partial X_{PHA}} & \frac{\partial f_2}{\partial X_{PP}} & \frac{\partial f_2}{\partial S_{O_2}} \\ \frac{\partial f_3}{\partial X_{PHA}} & \frac{\partial f_3}{\partial X_{PP}} & \frac{\partial f_3}{\partial S_{O_2}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_{PHA}^{X_{PHA}} \\ S_{PP}^{X_{PP}} \\ S_{O_2}^{S_{O_2}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial \mu_{PAO} X_{PAO}} \\ \frac{\partial f_2}{\partial \mu_{PAO} X_{PAO}} \\ \frac{\partial f_3}{\partial \mu_{PAO} X_{PAO}} \end{bmatrix} \quad \text{Ec. 66}$$

En el sistema de ecuaciones se observa que:

$$\frac{\partial f_1}{\partial S_{O_2}} = \frac{\partial f_2}{\partial S_{O_2}} = \frac{\partial f_3}{\partial S_{O_2}} = 0$$

Se deben considerar 7 sistemas de ecuaciones de funciones de sensibilidad, una para cada parámetro. Cada una de las ecuaciones se multiplicó por el valor nominal del parámetro correspondiente y dividió por el valor nominal de la variable. El sistema de ecuaciones se resuelve empleando la función ODE45.m de Matlab considerando que el valor de las funciones de sensibilidad en t=0 es cero.

Las funciones de sensibilidad calculadas en forma analítica se han comparado con las mismas funciones obtenidas en forma numérica por simulación aplicando la Ec. 13 (pag. 74). Ambas deben ser iguales.

Este análisis permite estudiar el efecto de los 7 parámetros en las variables X_{PHA} , X_{PP} y S_{O_2} . Las variables S_{PO_4} y X_{PP} presentan las mismas funciones de sensibilidad pero con el signo opuesto. Por esta razón solamente se considerarán las de X_{PP} . Las funciones de sensibilidad de X_{PHA} , X_{PP} y S_{O_2} se muestran en la Figura 53. Es posible observar una similitud importante entre las funciones de las dos edades de fango. Esto se explica si se considera que cada función de sensibilidad se multiplica por el valor nominal del parámetro en estudio y se divide por el valor medio de la variable para quitar el peso que puedan ejercer estos valores en el cálculo de las funciones de sensibilidad. Además, los parámetros calibrados en cada edad de fango presentan cierta similitud. Esto conduce a que las funciones de sensibilidad obtenidas sean prácticamente iguales.

El sistema de ecuaciones diferenciales que describe el comportamiento aerobio está formado por 3 ecuaciones, en las cuales las variables X_{PHA} y X_{PP} participan en todas las ecuaciones. Esto genera un alto grado de correlación del sistema que está representada en las funciones de sensibilidad por la matriz jacobiana J . Al incluir esta matriz las funciones de sensibilidad calculadas en forma analítica resultan iguales a las numéricas. A continuación se da una discusión del efecto observado de cada parámetro en las variables analizadas.

X_{PHA} :

Esta variable muestra una elevada sensibilidad a 4 parámetros de los 7 involucrados en este proceso. En primer lugar Y_{PAO} y $\mu_{PAO}X_{PAO}$, los cuales presentan iguales funciones de sensibilidad con efecto opuesto. Estos dos parámetros son colineales en relación a X_{PHA} , puesto que el cambio que produce uno de estos parámetros puede compensarse por una variación en el otro. Por esta razón estos dos parámetros no pueden determinarse a partir

de las medidas de X_{PHA} . En segundo lugar se encuentra $K_{PHA}X_{PAO}$ y en tercer lugar $K_{MAX}X_{PAO}$. Los restantes 3 parámetros: $K_{IPP}X_{PAO}$, $q_{PP}X_{PAO}$ e Y_{PHA} tienen un grado de sensibilidad mucho menor con respecto a esta variable.

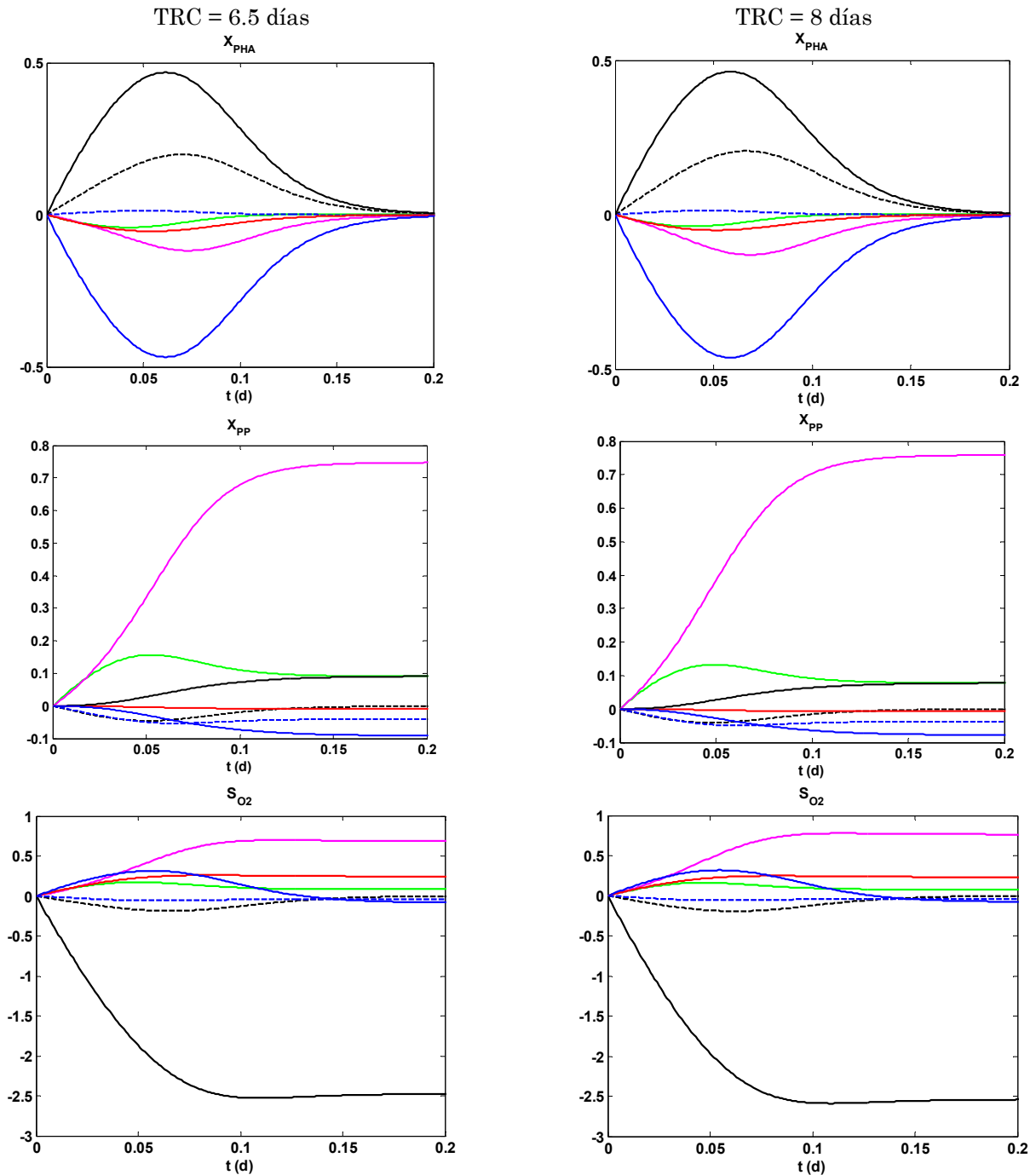


Figura 53: Funciones de sensibilidad de X_{PHA} , X_{PP} y S_{O_2} . (—) $q_{PP}X_{PAO}$, (---) $K_{PHA}X_{PAO}$, (—) $K_{MAX}X_{PAO}$, (---) $K_{IPP}X_{PAO}$, (—) Y_{PHA} , (—) Y_{PAO} , (—) $\mu_{PAO}X_{PAO}$.

La elevada influencia que describen los parámetros Y_{PAO} , $\mu_{PAO}X_{PAO}$, $K_{PHA}X_{PAO}$ y $K_{MAX}X_{PAO}$ con respecto a X_{PHA} se puede explicar considerando los procesos descritos por la ecuación diferencial Ec. 46 (pag. 180). Esta ecuación está compuesta por dos términos: el primero representa el consumo de X_{PHA} debido a la acumulación de fósforo y el segundo el consumo que se produce por crecimiento. Los parámetros Y_{PAO} y $\mu_{PAO}X_{PAO}$ controlan el proceso por crecimiento y el parámetro $K_{PHA}X_{PAO}$ controla la función “switch” de semisaturación de X_{PHA} . $K_{MAX}X_{PAO}$ determina la concentración máxima de fósforo que puede ser acumulado en forma de X_{PP} , por lo tanto establece el momento en el cual la velocidad de este proceso se detiene. Conforme a las funciones de sensibilidad obtenidas se debe acentuar el muestreo en el intervalo del experimento donde se produce la mayor velocidad de consumo de X_{PHA} .

X_{PP} :

Esta variable presenta una mayor sensibilidad al parámetro $K_{MAX}X_{PAO}$ y en menor grado al parámetro $q_{PP}X_{PAO}$. Es posible observar en la Figura 53 que las trayectorias de sensibilidad de Y_{PAO} y $\mu_{PAO}X_{PAO}$ son iguales y opuestas. Estos parámetros son colineales con respecto a X_{PP} . Esto se explica observando la Ec. 44 (pag. 179) que describe la variación de X_{PP} con el tiempo. En esta expresión no se encuentran los parámetros Y_{PAO} y $\mu_{PAO}X_{PAO}$, su influencia viene dada a través de X_{PHA} . Puesto que el efecto de Y_{PAO} y $\mu_{PAO}X_{PAO}$ en X_{PHA} es colineal, el mismo efecto se transfiere a X_{PP} .

La ecuación diferencial que describe la evolución de X_{PP} está compuesta por un único término. El parámetro $K_{MAX}X_{PAO}$ determina cuánto acumularán las bacterias con lo cual establece el momento en el que se detendrá el proceso de acumulación de fósforo. Este parámetro presenta una gran sensibilidad en la zona final del ensayo, es decir cuando la concentración de X_{PP} se aproxima al valor de $K_{MAX}X_{PAO}$.

S_{O_2} :

Esta variable está influenciada principalmente por Y_{PAO} y en segundo lugar por $K_{MAX}X_{PAO}$. La influencia de Y_{PAO} en el consumo de oxígeno es negativa, indicando que un aumento en este rendimiento genera una disminución en el consumo de oxígeno. Y_{PAO} es el rendimiento de las bacterias PAO por unidad de X_{PHA} y $1-Y_{PAO}$ es la cantidad de oxígeno que se consume por crecimiento por unidad de X_{PHA} . De esta manera si el rendimiento aumenta disminuye el consumo de oxígeno. La influencia de $K_{MAX}X_{PAO}$ es positiva a lo largo del ensayo. Este efecto se debe a la necesidad de aumentar el consumo de oxígeno cuando se acumula una mayor proporción de fósforo.

En el procedimiento de calibración se emplean los datos experimentales de la OUR, por lo cual presenta un gran interés estudiar las funciones de sensibilidad de esta variable. Para el cálculo analítico de la función se debería conocer $dOUR/dt$. Dada la complejidad de la ecuación y la imposibilidad de obtener una expresión explícita respecto al tiempo se optó por calcularla en forma numérica por medio de la Ec. 13 (pag. 74).

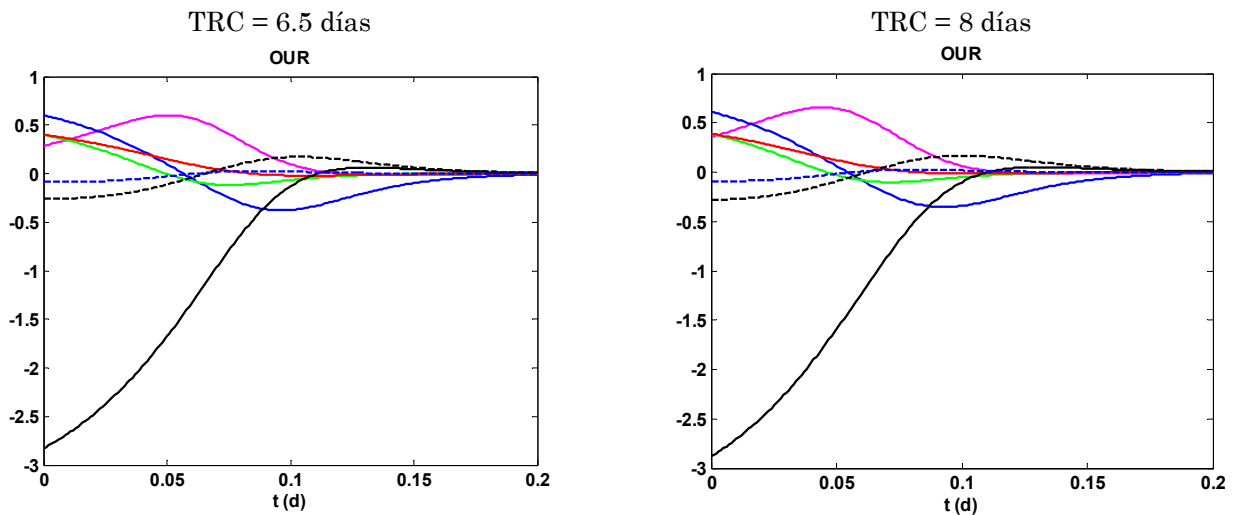


Figura 54: Funciones de sensibilidad de la OUR. (—) $q_{PP}X_{PAO}$, (---) $K_{PHA}X_{PAO}$, (—) $K_{MAX}X_{PAO}$, (---) $K_{IP}X_{PAO}$, (—) Y_{PHA} , (—) Y_{PAO} , (—) $\mu_{PAO}X_{PAO}$.

OUR:

Se observa en la Figura 54 que el valor inicial de las funciones de sensibilidad de esta variable no es cero, puesto que el valor que toma la $OUR = -dS_{O_2}/dt$ en $t=0$ sí depende de los parámetros. El rendimiento Y_{PAO}

ejerce una influencia muy importante al inicio del ensayo. Un aumento de este parámetro provoca una disminución importante del valor de la OUR al inicio del experimento. Se observa que los parámetros $K_{MAX}X_{PAO}$ y $\mu_{PAO}X_{PAO}$ ejercen también cierta influencia en la velocidad del consumo de oxígeno, mientras que el resto de parámetros no muestran una apreciable sensibilidad.

A partir de los datos de la velocidad del consumo de oxígeno es posible lograr una adecuada identificación de los parámetros Y_{PAO} , $K_{MAX}X_{PAO}$ y $\mu_{PAO}X_{PAO}$. Para esto se debería aumentar la frecuencia del muestreo principalmente al inicio del experimento.

La incorporación de los datos de X_{PHA} en el procedimiento de calibración *off-line* mejora notablemente la identificabilidad de los parámetros. Se ha observado en el procedimiento de calibración que un valor bajo del rendimiento Y_{PAO} o un valor alto de $\mu_{PAO}X_{PAO}$ permiten representar en forma adecuada las elevadas velocidades de consumo de X_{PHA} , registradas experimentalmente. Sin embargo, un rendimiento bajo (Y_{PAO}) conduce a valores de la OUR superiores a los observados experimentalmente. Esto indica que al considerar el conjunto de datos experimentales de la OUR, el fósforo soluble, S_{PO_4} , y el polímero X_{PHA} es posible lograr una mejor identificación de los parámetros más importantes del proceso de las bacterias PAO en condiciones aerobias.

Si se tiene en cuenta únicamente el registro de la OUR y X_{PP} (S_{PO_4}) los parámetros más sensibles que pueden ser determinados a partir de estas medidas son Y_{PAO} , $K_{MAX}X_{PAO}$, $\mu_{PAO}X_{PAO}$ y $q_{PP}X_{PAO}$. Al considerar el registro de X_{PHA} es posible mejorar la identificabilidad de los parámetros $K_{PHA}X_{PAO}$ y $K_{MAX}X_{PAO}$. Es decir, de los 7 parámetros que se deben identificar a partir de los datos experimentales, 5 de ellos muestran una elevada influencia en las variables estudiadas: Y_{PAO} , $K_{MAX}X_{PAO}$, $q_{PP}X_{PAO}$, $\mu_{PAO}X_{PAO}$ y $K_{PHA}X_{PAO}$ siendo $K_{IPP}X_{PAO}$, e Y_{PHA} pobremente identificables a partir de los datos disponibles.

Los resultados del análisis de sensibilidad son similares en ambas edades de fango. De esta manera en un TRC próximo a los estudiados en esta sección el comportamiento de los parámetros será semejante al observado en estos análisis de sensibilidad. Por tanto, el procedimiento de calibración *off-line* se podría mejorar aumentando la frecuencia del muestreo de acuerdo a los resultados obtenidos en esta sección.

4.3.2 Propuesta de calibración del modelo BNRM1

El objetivo final de esta tesis es la propuesta de un procedimiento de calibración del modelo BNRM1 basado no sólo en ensayos específicos sino que además considere datos dinámicos de la planta piloto. Estos datos permitirán la identificación de los parámetros sensibles que no se determinan mediante ensayos específicos. Para formular esta propuesta de calibración del modelo BNRM1, la cual se presenta en forma esquemática en la Figura 55, se han considerado los protocolos descritos en el apartado 1.7.3.

A continuación se describen brevemente en qué consisten cada una de las etapas que componen la calibración del modelo BNRM1:

- 1- Calibración *off-line* de los parámetros empleando el procedimiento propuesto por Peña-Roja y col., (2002). Se optimizará el muestreo en cada ensayo de acuerdo a los resultados del análisis de sensibilidad de los ensayos de calibración *off-line*. Se incorporará la medición de X_{PHA} en la calibración de las bacterias PAO en condiciones aerobias.
- 2- Simulación del comportamiento en estado estacionario de la planta piloto con el programa DESASS, para lo cual se emplean los parámetros calibrados en el punto 1 y la caracterización del influente en estado estable. Los datos experimentales de los reactores y el efluente de la planta que representa el comportamiento estacionario del proceso se comparan con los predichos por el modelo con la finalidad de

verificar el procedimiento de calibración *off-line*. Esta etapa de simulación del proceso permite conocer el comportamiento estacionario del mismo.

- 3- Análisis de sensibilidad en estado estacionario, ver apartado 1.7.2.2. El análisis de sensibilidad se emplea en esta etapa para determinar la medida de la sensibilidad (δ_j) de los parámetros del modelo, el índice de colinealidad γ_K , y la medida del determinante ρ_K , con K el subconjunto de parámetros (Brun y col., 2002). Este análisis permite seleccionar el conjunto de parámetros no calibrados en ensayos específicos que sean muy influyentes en la respuesta del modelo.

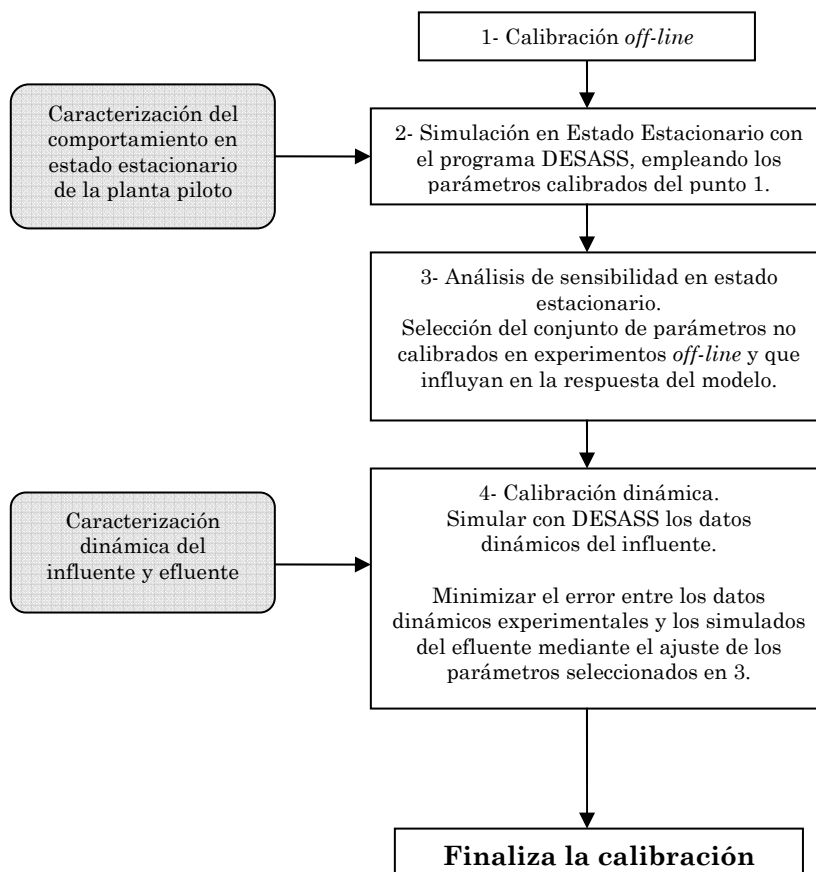


Figura 55: Propuesta de calibración del modelo BNRM1.

- 4- Calibración dinámica. Esta etapa consta de los siguientes pasos:

- a- Tomar como punto de inicio el estado estacionario simulado en el punto 2 (Vanrolleguem y col., 2003). De esta manera se conocen las concentraciones de las componentes particuladas en los distintos reactores de la planta.
- b- Incorporar los datos dinámicos del influente al programa DESASS y simular el comportamiento de la planta piloto. Las variables muestreadas del efluente se comparan con los valores predichos por el modelo. Los parámetros del modelo BNRM1 no calibrados en ensayos específicos y seleccionados de acuerdo al análisis de sensibilidad del punto 3 se ajustan para lograr la minimización de la suma del error cuadrático entre los datos experimentales y simulados.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en cada una de las etapas que componen esta propuesta de calibración del modelo BNRM1.

La fase experimental se desarrolló con el Esquema de operación 2, ver apartado 3.1.2, con una edad de fango de 9 días.

4.3.2.1 Etapa N°1: Calibración off-line del modelo BNRM1

En esta sección se exponen los resultados del procedimiento de calibración *off-line* del modelo. De acuerdo al análisis de sensibilidad, desarrollado en el apartado 4.3.1.2, en cada ensayo se puede mejorar el procedimiento de identificación de los parámetros aumentando la frecuencia del muestreo en el intervalo del experimento donde estos parámetros son más sensibles. De esta manera, en los ensayos donde se ha considerado que la frecuencia no era lo suficientemente elevada, se ha procedido a aumentarla de acuerdo a los resultados del análisis de sensibilidad de los ensayos de calibración *off-line*.

El procedimiento y ecuaciones empleadas se han descrito con mayor detalle en los apartados 4.3.1.1.1 al 4.3.1.1.6. Por esta razón se procederá a exponer solamente las gráficas y los valores de los parámetros obtenidos en cada caso.

4.3.2.1.1 Bacterias Heterótrofas:

a. Rendimiento de las bacterias heterótrofas Y_H :

La Figura 56 muestra la evolución en el tiempo de la OUR, y el consumo de oxígeno. Con este último registro y la DQO que se consume en el ensayo se calcula el rendimiento Y_H . En la Tabla 49 se muestran los resultados obtenidos.

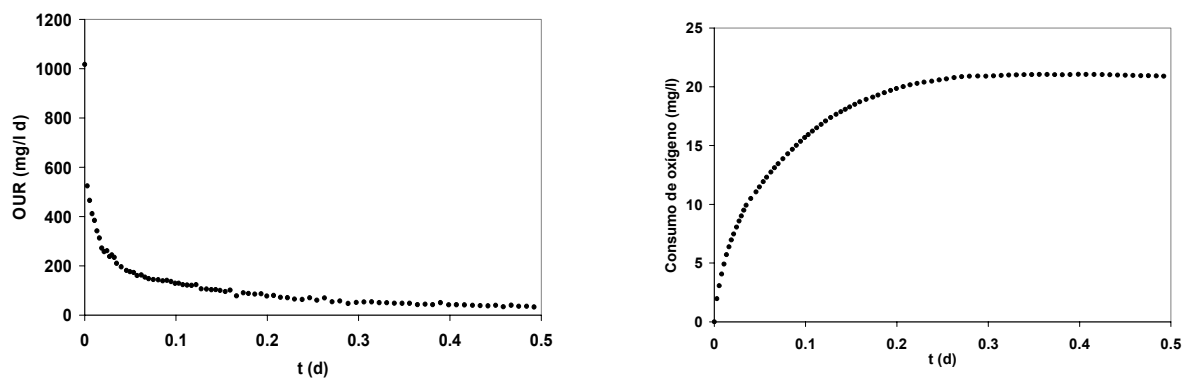


Figura 56: Evolución temporal de OUR y del oxígeno consumido.

Tabla 49: Consumo de oxígeno, DQO degradada y valor de la Y_H a TRC = 9 días.

S_{O_2} consumido (mg DQO/l)	21.4
S_F degradada (mg DQO/l)	53.4
Y_H (mg DQO/mg DQO)	0.60

b. Parámetros cinéticos:

La gráfica que se expone a continuación muestra la curva de Monod de las bacterias heterótrofas:

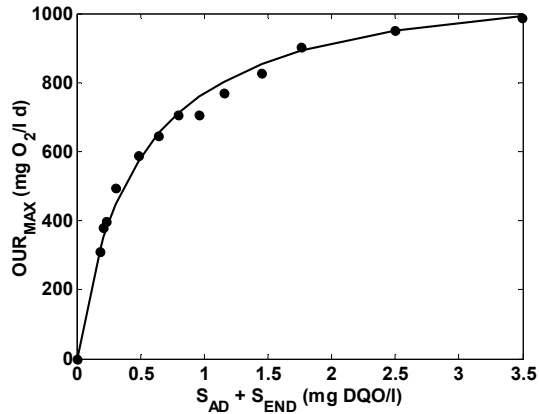


Figura 57: Velocidad de consumo de oxígeno respecto a la concentración inicial de sustrato. (●): experimental, (—) ajuste del modelo.

A partir del análisis de sensibilidad de la curva de Monod de las bacterias heterótrofas se ha considerado necesario aumentar el muestreo en la zona donde $S_{AD}+S_{END}$ se aproxima al valor de K_F , y donde la OUR es máxima. Se observa en la Figura 57 que se ha logrado un mejor muestreo en ambas zonas si se compara con las curvas de Monod de las bacterias heterótrofas anteriores. Los parámetros obtenidos se exponen en la Tabla 50.

Tabla 50: Parámetros ajustados de la curva de Monod de las bacterias heterótrofas a TRC = 9 días.

$\frac{1-Y_H}{Y_H} \mu_H X_H$ (mg DQO/l d)	1126.1
K_F (mg DQO/l)	0.47

4.3.2.1.2 Bacterias Autótrofas

El procedimiento de calibración de las bacterias autótrofas también se realizó empleando un muestreo más exhaustivo en las zonas donde los parámetros tienen mayor influencia. En la Figura 58 se presenta la curva de Monod de las bacterias autótrofas y los parámetros obtenidos del ajuste se exponen en la Tabla 51.

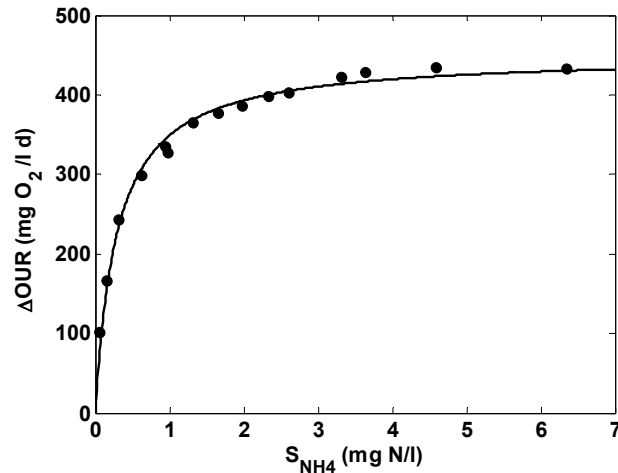


Figura 58: ΔOUR respecto a la concentración inicial de S_{NH_4} en cada experimento. (•): experimental, (—) ajuste del modelo.

Tabla 51: Parámetros ajustados de la curva de Monod de las bacterias autótrofas para TRC = 9 días.

$\frac{4.57 - Y_A}{Y_A} \mu_{AUT} X_{AUT}$ (mg DQO/l d)	449.98
K_{NH_4} (mg N/l)	0.29

4.3.2.1.3 Bacterias PAO

En esta sección se describe el procedimiento de calibración de los parámetros de los microorganismos acumuladores de fósforo.

a. Determinación de los parámetros cinéticos q_{PHA} y K_A :

El análisis de sensibilidad del ensayo de calibración en condiciones anaerobias ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar una frecuencia de muestreo elevada en el período intermedio y final de cada ensayo. Sin embargo, como la toma de muestras se lleva a cabo habitualmente con una frecuencia elevada, el muestreo se ha sido realizado en forma similar al de las edades de fango anteriores. En la Figura 59 se presentan los datos experimentales de S_A respecto al tiempo y el ajuste obtenido. Los parámetros resultantes de dicho ajuste se muestran en la Tabla 52.

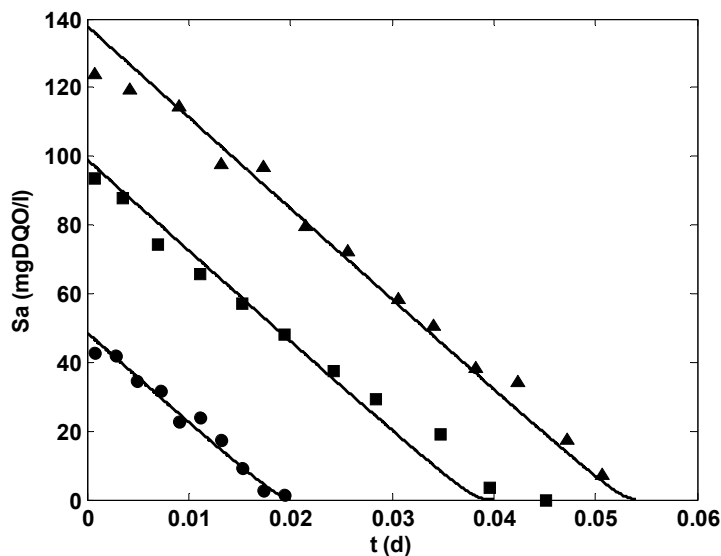


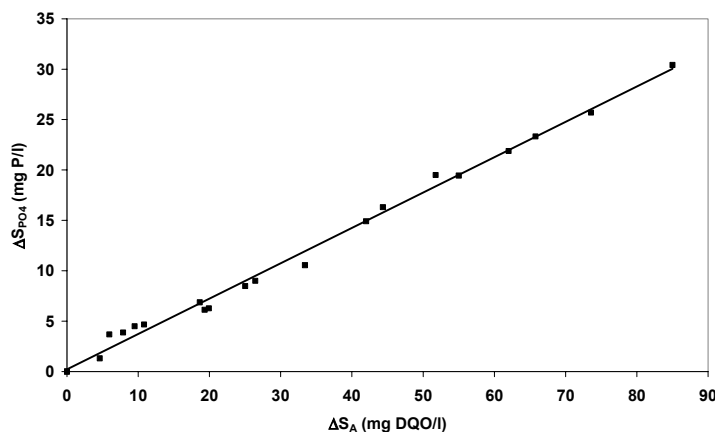
Figura 59: Evolución temporal del ácido acético en el ensayo anaerobio para TRC = 9 d. (●) Reactor 1, (■) Reactor 2, (▲) Reactor 3, (—) ajuste del modelo.

Tabla 52: Parámetros de las bacterias PAO en condiciones anaerobias a TRC = 9 días.

$q_{PHAX_{PAO}}$ (mg DQO/l d)	2680.00
K_A (mg DQO/l)	1.00

b. Parámetro estequiométrico Y_{PO4} :

El parámetro Y_{PO4} se obtiene del ajuste por mínimos cuadrados del incremento de S_{PO4} respecto al consumo de S_A . Los datos experimentales y su ajuste se muestran en la figura siguiente.



$$\Delta S_{PO4} = 0.3508 * \Delta S_A + 0.2224; R^2=0.99$$

Figura 60: Cálculo de Y_{PO4} para TRC = 9 días.

c. Parámetros cinéticos en condiciones aerobias

Los resultados obtenidos del análisis de sensibilidad mostraron que los parámetros Y_{PAO} , $\mu_{PAO}X_{PAO}$, $K_{MAX}X_{PAO}$, $K_{PHA}X_{PAO}$ y $q_{PP}X_{PAO}$ presentan una elevada sensibilidad. Para lograr mejorar su identificabilidad se ha aumentado la frecuencia de la toma de muestras en el intervalo del experimento en el cual estos parámetros presentan mayor influencia en la respuesta del modelo. Por esta razón, cada una de las variables que se analizan en este experimento se han muestreado de la siguiente manera:

- * La concentración del polímero X_{PHA} se ha muestreado con más intensidad en la zona intermedia del experimento, en la cual se produce la mayor velocidad de consumo del polihidroxialcanoato. Realizando una toma adecuada de muestras en este intervalo se puede mejorar la identificabilidad de $K_{PHA}X_{PAO}$ y $K_{MAX}X_{PAO}$.
- * La concentración del fósforo soluble, SP_{O4} , se ha muestreado con mayor intensidad hacia el final del experimento. En este período del ensayo el parámetro $K_{MAX}X_{PAO}$ presenta una notable sensibilidad.
- * La velocidad del consumo de oxígeno, OUR , se determina con el equipo experimental descrito en la Figura 18. Dado que este procedimiento permite medir la OUR con una elevada frecuencia a lo largo de todo el experimento, se ha realizado un muestreo similar al de los experimentos anteriores.

En la Tabla 53 se recogen los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste.

Tabla 53: Parámetros cinéticos de las bacterias PAO en condiciones aerobias a TRC = 9 días.

Parámetro	Valor
Y_{PAO} (mg DQO/mg DQO)	0.79
$\mu_{PAO} X_{PAO}$ (mg DQO/l d)	1971.00
$K_{PHA} X_{PAO}$ (mg DQO/l)	50.95
$q_{PP} X_{PAO}$ (mg P/l d)	2248.62
$K_{IPP} X_{PAO}$ (mg P/l)	18.98
$K_{MAX} X_{PAO}$ (mg P/l)	215.35

Los datos experimentales y el ajuste correspondiente se muestran en la Figura 61. En este caso también se observó que la concentración del polímero X_{PHA} tiende a un valor mínimo. En la Figura 61 sólo se muestran los datos de X_{PHA} considerados en el procedimiento de calibración.

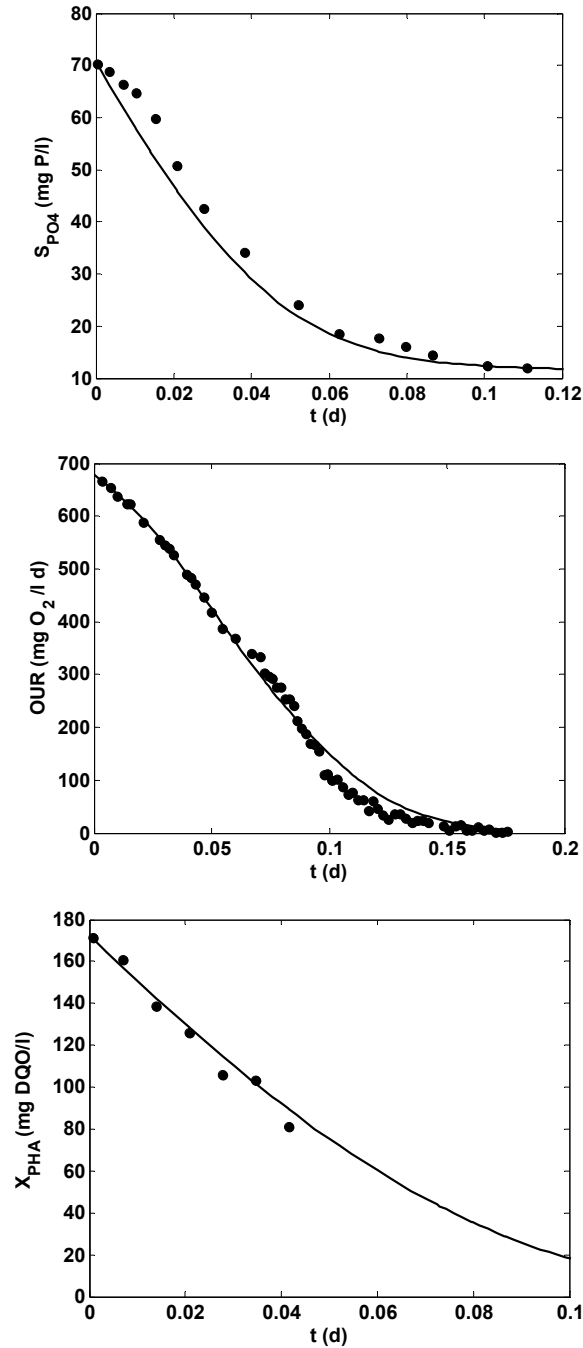


Figura 61: Comportamiento aerobio de las bacterias PAO a TRC = 9 días.
 (●) Datos experimentales, (-) ajuste del modelo.

4.3.2.1.4 Factores de eficacia de la desnitrificación

a. Factor η_{PAO} y η_{PP} :

En la figura siguiente se muestra la disminución de la concentración de fósforo con el tiempo en las dos condiciones de trabajo: anóxica y aerobia. De estas dos curvas se calcula la velocidad inicial de consumo de fósforo. Las velocidades obtenidas en unidades de mg O/l min y el factor η_{PP} se exponen en la Tabla 54.

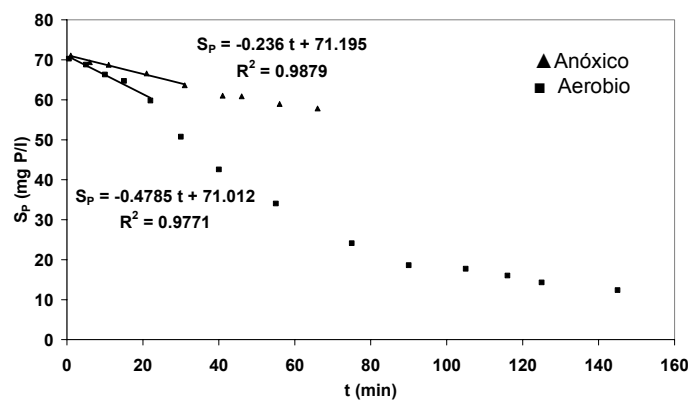


Figura 62: Concentración de S_P en el reactor anóxico y aerobio para TRC= 9 días.

Tabla 54: Velocidades iniciales del consumo de fósforo en condiciones anóxicas y aerobias y factor de eficacia η_{PP} a TRC = 9 días.

$(-dS_{PO_4}/dt)_{anóxica}$ (mg O/l min)	0.0472
$(-dS_{PO_4}/dt)_{aerobia}$ (mg O/l min)	0.0957
η_{PP}	0.49

El parámetro η_{PAO} se obtiene de la evolución de la concentración de nitratos, S_{NO_3} , de la experiencia en condiciones anóxicas y del valor de la OUR inicial del ensayo de las PAO en condiciones aerobias. En la Figura 63 se observa la concentración de nitratos en función del tiempo, de la cual se ha obtenido la velocidad inicial en unidades de oxígeno.

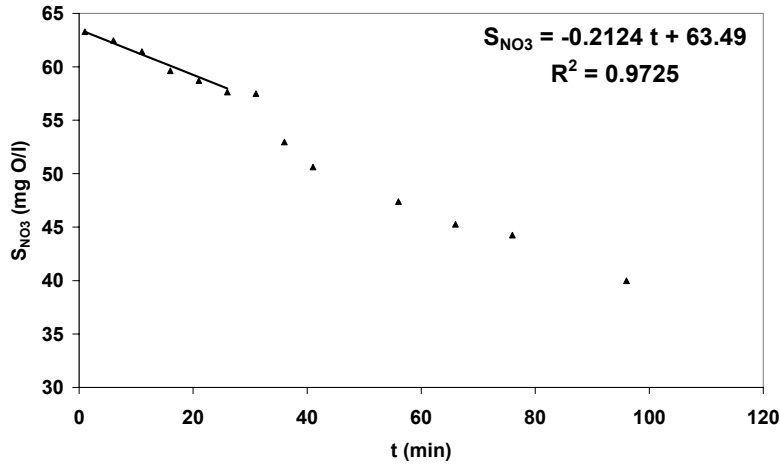


Figura 63: Evolución de S_{NO3} en el proceso de desnitrificación de las bacterias PAO a TRC = 9 días.

El parámetro η_{PAO} se obtiene de la relación entre el consumo de nitrato y oxígeno debido únicamente al crecimiento:

$$\eta_{PAO} = \frac{0.2124 - 0.0472}{0.6086 - 0.0957} = 0.32$$

b. Factor η_H :

El factor de eficacia de la desnitrificación de las bacterias heterótrofas se ha obtenido de la velocidad inicial del consumo de S_{NO3} respecto a la OUR inicial. Este último valor se obtiene de la curva de la OUR del experimento en el cual se determina el parámetro Y_H.

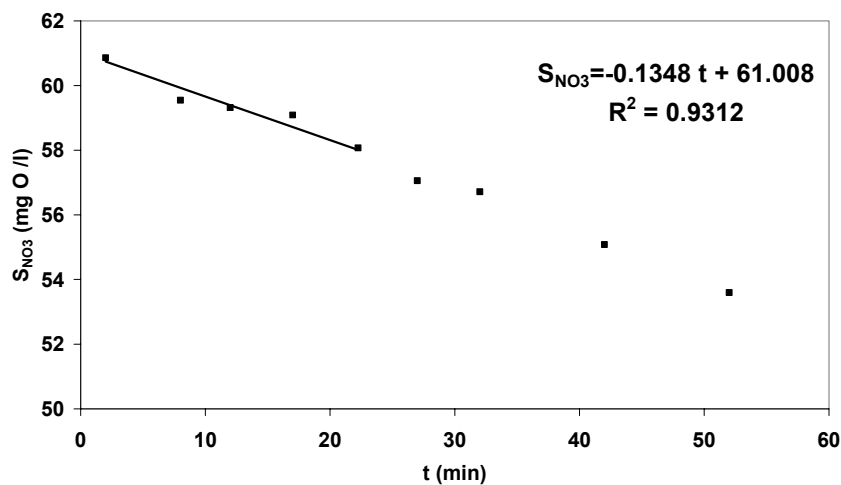


Figura 64: Evolución de S_{NO3} en el tiempo para TRC = 9 días.

En la Figura 64 se muestra la evolución de la concentración de S_{NO_3} en el tiempo y en la Tabla 55 se dan las velocidades iniciales obtenidas y el factor de eficacia η_H .

Tabla 55: Velocidades iniciales del consumo de nitratos y oxígeno y valor del parámetro η_H a TRC = 9 días.

$(-dS_{NO_3}/dt \text{ 2.86})$ (mg O/l min)	0.1348
$(-dS_o/dt)$ (mg O/l min)	0.3640
η_H	0.374

4.3.2.1.5 Resultados de la Calibración off-line del modelo BNRM1 a TRC = 9 días

En esta sección se presentan los resultados obtenidos con el tratamiento global de la información. El procedimiento de cálculo es el mismo del apartado 4.3.1.1.4. Este algoritmo permite determinar los parámetros cinéticos y las velocidades de muerte celular de cada tipo de bacteria. En la Tabla 56 se recogen los valores de los parámetros obtenidos con este procedimiento en el TRC de 9 días.

Tabla 56: Parámetros calibrados mediante ensayos off-line a TRC = 9 días.

	Parámetro	Valor
Bacterias Heterótrofas	Y_H (mgDQO/mgDQO)	0.60
	μ_H (d ⁻¹)	2.00
	η_H	0.37
	b_H (d ⁻¹)	0.40
	K_F (mgDQO/l)	0.47
Bacterias Autótrofas	μ_{AUT} (d ⁻¹)	1.20
	b_{AUT} (d ⁻¹)	0.20
	K_{NH_4} (mgN/l)	0.29
Bacterias PAO	Y_{PAO} (mgDQO/mgDQO)	0.79
	Y_{PO_4} (mgP/mgDQO)	0.35
	μ_{PAO} (d ⁻¹)	2.70
	q_{PHA} (mgDQO/mgDQO d ⁻¹)	3.67
	q_{PP} (mgP/mgO d ⁻¹)	3.08
	b_{PAO} (d ⁻¹)	0.20
	K_A (mg DQO/l)	1.00
	K_{PHA} (mgO/mgO)	0.070
	K_{MAX} (mgP/mgO)	0.30
	K_{IPP} (mgP/mgO)	0.026
	η_{PAO}	0.32
η_{PP}	0.49	

4.3.2.2 Etapa N°2: Simulación del Estado Estacionario a TRC = 9 días

El procedimiento realizado en este apartado es similar al que se describe en la sección 4.3.1.1.7. Se ha empleado el procedimiento de caracterización físico-químico con un tamaño de filtro de 0.1 μm . Las fracciones del agua residual que representan la calidad del influente de este período se detallan en la Tabla 57.

Tabla 57: Caracterización del influente a TRC = 9 días.

	Concentración
S_F (mg DQO/l)	92
S_A (mg DQO/l)	105
S_I (mg DQO/l)	31
X_S (mg DQO/l)	110
X_I (mg DQO/l)	68
S_{PO_4} (mg P/l)	8.5
S_{NH_4} (mg N/l)	40.2
S_{NO_3} (mg N/l)	0.2

En el proceso de simulación se observó la necesidad de tomar un valor menor de X_I al obtenido con el procedimiento de caracterización físico-químico. Este valor de X_I genera un contenido de DQO en los reactores superior a los datos experimentales. Para lograr que los valores predichos por el modelo y las medidas reales sean similares se ha considerado una fracción $X_I = 26$ mg DQO/l.

Los resultados obtenidos con el programa DESASS y los datos experimentales de la caracterización analítica de la planta piloto se recogen en la Tabla 58.

El proceso de simulación ha permitido reproducir los valores experimentales de las distintas etapas del proceso. Conforme a los resultados obtenidos se considera que el procedimiento de calibración *off-line* se ha realizado en forma adecuada.

Tabla 58: Valores experimentales y simulados correspondientes a TRC = 9 días.

	Reactor Anaerobio		Reactor Anóxico		Reactor Aerobio		Efluente	
	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.
DQO _{TOTAL} (mg DQO/L)	2410	2405	3195	3272	3188	3234	45	61
DQO _{SOL} (mg DQO/L)							34	33
SST (mg SST /l)	1862	1793	2538	2536	2532	2550	23	22
SSV (mg SST /l)	1356	1380	1952	1957	1929	1972	14	17
S _{PO4} (mgP/L)	23.1	23.3	12.7	13.3	1.4	1.3	1.3	1.3
S _{NH4} (mgN/L)	20.8	20.6	11.8	11.5	0.2	0.2	0.1	0.2
S _{NO3} (mg N/L)	0.9	0.0	0.5	0.0	8.1	7.6	8.1	7.6
N _{T SOL} (mg N/L)	22.8	22.3	12.9	13.1	8.7	9.2	8.7	9.2
N _{TOT} (mg N/L)							10.5	11.1
AGV (mg DQO/L)	0	2.9	0	0.1	0	0.1	0	0

4.3.2.3 Etapa N°3: Análisis de sensibilidad del sistema en Estado Estacionario

En el apartado 4.3.2.1 ciertos parámetros se han calibrado mediante ensayos específicos en laboratorio. Estos parámetros son considerados de elevada influencia en la respuesta del modelo. En esta sección se ha planteado la realización de un análisis de sensibilidad del sistema en estado estacionario con el fin de:

- a- establecer si todos los parámetros calibrados en los experimentos de laboratorio muestran una elevada sensibilidad en la respuesta del modelo,
- b- estudiar cómo se comporta el grupo restante de parámetros que no se determinan en estos ensayos específicos,
- c- seleccionar las variables del efluente que muestren elevada sensibilidad a las perturbaciones de los parámetros, y
- d- seleccionar, del conjunto de parámetros no calibrados en los ensayos específicos, un subconjunto que sea potencialmente identificable a partir de los datos dinámicos disponibles.

Para llevar a cabo el análisis de sensibilidad del sistema en estado estacionario es necesario calcular la sensibilidad de cada parámetro, $S_{p_j}^{x_i}$, por simulación, para lo cual se emplea la Ec. 11 (pag. 73).

Se han tenido en cuenta determinados aspectos que son fundamentales para desarrollar el análisis de sensibilidad propuesto. Dichos aspectos se detallan a continuación:

- 1- El cálculo de la sensibilidad, $S_{p_j}^{x_i}$, se obtiene perturbando el parámetro p_j un Δp_j . En este trabajo se ha empleado una perturbación $\Delta p_j = 0.01 \times p_j$ (Melcer y col., 2003), es decir se aplica una variación positiva del 1% al parámetro. De esta manera la Ec. 11 se puede expresar de la siguiente forma:

$$S_{p_j}^{x_i} = \frac{\Delta x_i}{0.01 \times p_j} \frac{p_j}{x_i} = \frac{\Delta x_i}{x_i} \frac{1}{0.01} = \frac{\Delta x_i}{x_i} 100$$

Al aplicar una modificación de un 1% en el valor del parámetro se obtiene la variación porcentual de x_i respecto al estado inicial de esta variable.

- 2- En este estudio se ha considerado como estado no perturbado la simulación en condiciones estables de la planta piloto realizada en la Etapa N°2.
- 3- Se han tenido en cuenta únicamente las concentraciones S_{NH_4} , S_{NO_3} , N_{TSOL} , S_{PO_4} y DQO_{SOL} del efluente de la planta piloto para llevar a cabo el análisis de sensibilidad propuesto. Estas variables reflejan el resultado de los principales procesos: eliminación biológica de fósforo, nitrógeno y materia orgánica. Se han considerado las concentraciones solubles dado que poseen un menor error experimental que las componentes totales.
- 4- El número de parámetros considerados del modelo BNRM1 son 136. En esta cifra están incluidos los parámetros cinéticos, estequiométricos y las constantes de temperatura.

Los pasos seguidos para calcular las sensibilidades $S_{p_j}^{X_i}$ se mencionan a continuación:

- 1- Se toma el parámetro p_j y se aplica la perturbación $\Delta p_j = 0.01 \times p_j$. El valor del parámetro resulta $p_j = p_j + 0.01 \times p_j$.
- 2- Se incorpora esta modificación del parámetro p_j en el archivo del programa DESASS en el cual se encuentra el proceso simulado en condiciones estables (Etapa N°2). Se simula nuevamente el sistema hasta que el programa alcance una solución.
- 3- Se calculan las sensibilidades del parámetro p_j respecto a las cinco variables seleccionadas: $S_{p_j}^{S_{NH4}}$, $S_{p_j}^{S_{NO3}}$, $S_{p_j}^{N_{TOT SOL}}$, $S_{p_j}^{S_{PO4}}$, $S_{p_j}^{DQO_{SOL}}$.

Estos tres pasos se repiten con cada uno de los parámetros del modelo. De esta manera, se obtiene una matriz $S_{5 \times 136}$ compuesta por las sensibilidades individuales $S_{p_j}^{X_i}$.

Si bien los valores de $S_{p_j}^{X_i}$ permiten analizar el efecto que cada parámetro tiene sobre las variables en forma individual, la medida de la sensibilidad, δ_j , permite reflejar la importancia de cada parámetro p_j sobre todas las variables analizadas en forma cuantitativa. Esta medida se calculó para cada parámetro mediante la Ec. 17 (pag. 76). En la Tabla 59 - A y la Tabla 59 - B se recogen los valores obtenidos de δ_j ordenados de mayor a menor. Los parámetros con mayor valor de medida de sensibilidad, δ_j , son los que poseen más influencia en la respuesta del modelo. Por comodidad se ha organizado la información en dos tablas. Las casillas sombreadas indican los parámetros que se determinan experimentalmente mediante ensayos específicos.

Tabla 59 - A: Parámetros 1 al 70 del modelo BNRM1 según el valor de la medida de la sensibilidad, δ_j .

Nº	δ_j	Parámetros	Proceso	Nº	δ_j	Parámetros	Proceso
1	4.208	Y_{PAO}	PAO	36	0.120	K_{O_2}	HID
2	3.449	μ_{AUT}	AUT	37	0.111	Y_{AUT}	AUT
3	2.924	K_{MAX}	PAO	38	0.106	K_{H_2}	MET_HID
4	2.339	b_{AUT}	AUT	39	0.102	f_{XI}	MET_ACET
5	2.206	μ_{ACID}	ACID	40	0.095	K_{NO_3}	MET_HID
6	1.798	b_{ACID}	ACID	41	0.095	K_F	HET
7	1.751	b_{PAO}	PAO	42	0.095	K_{PRO}	PAO
8	1.147	Y_{PO_4}	PAO	43	0.093	K_X	HID_ACID
9	1.048	q_{PP}	PAO	44	0.092	K_P	AUT
10	0.979	μ_{PAO}	PAO	45	0.088	K_H	AUT
11	0.858	K_{NH_4}	AUT	46	0.083	K_A	ACET
12	0.813	K_{O_2}	HET	47	0.083	K_{NO_3}	HET
13	0.797	η_{PP}	PAO	48	0.082	K_{NO_3}	PAO
14	0.737	K_{O_2}	AUT	49	0.078	K_{PRO}	ACET
15	0.731	$K_{PHA PP}$	PAO	50	0.078	K_P	ACET
16	0.669	$K_{PHA PAO}$	PAO	51	0.077	K_{NH_4}	MET_ACET
17	0.636	η_{NO_3}	HID	52	0.077	K_{NH_4}	ACET
18	0.533	Y_{PHA}	PAO	53	0.077	$K_T(\mu_{AUT})$	AUT
19	0.517	K_F	ACID	54	0.073	$K_T(\mu_{ACID})$	ACID
20	0.394	K_{IPP}	PAO	55	0.072	K_X	HID
21	0.339	b_{PP}	PAO	56	0.071	Y_{ACID}	ACID
22	0.331	K_{NH_4}	HET	57	0.070	f_{SI}	HID_ACID
23	0.299	Y_H	HET	58	0.069	b_{PHA}	PAO
24	0.251	K_{NO_3}	ACID	59	0.066	K_{IH}	AUT
25	0.212	K_{PS}	PAO	60	0.065	K_{NH_4}	MET_HID
26	0.197	b_H	HET	61	0.064	K_{ALK}	PAO
27	0.191	μ_H	HET	62	0.063	K_{O_2}	MET_HID
28	0.175	K_{NO_3}	HID	63	0.062	b_{PRO}	ACET
29	0.175	K_H	HID_ACID	64	0.062	$K_T(b_H)$	HET
30	0.169	η_{PAO}	PAO	65	0.061	f_{XI}	HET
31	0.164	η_{Fe}	HID	66	0.060	$K_T(b_{AUT})$	AUT
32	0.160	K_H	HID	67	0.058	K_{O_2}	ACID
33	0.138	K_A	ACID	68	0.058	K_{IH}	HET
34	0.132	η_H	HET	69	0.057	b_{MH_2}	MET_HID
35	0.125	q_{PHA}	PAO	70	0.055	f_{XI}	ACID

PROCESOS. PAO: Bacterias acumuladoras de fósforo; AUT: Bacterias autótrofas; ACID: Bacterias acidogénicas; HET: Bacterias heterótrofas; HID: Hidrólisis; HID_ACID: Hidrólisis de acidogénicas; ACET: Bacterias acetogénicas; MET_ACET: Bacterias metanogénicas acetotróficas; MET_HID: Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas.

Tabla 59 - B. Parámetros 71 al 136 del modelo BNRM1 según el valor de la medida de la sensibilidad, δ_j .

N°	δ_j	Parámetros	Proceso	N°	δ_j	Parámetros	Proceso
71	0.054	K_{NH_4}	PAO	104	0.026	K_{IH}	ACID
72	0.053	$K_{T(bMAC)}$	MET_ACET	105	0.025	$K_{T(bMH_2)}$	MET_HID
73	0.052	K_{H_2}	ACID	106	0.024	K_{O_2}	ACET
74	0.051	K_P	PAO	107	0.024	K_{NO_3}	MET_ACET
75	0.050	K_H	MET_HID	108	0.023	K_{IH}	MET_ACET
76	0.049	K_{IH}	ACET	109	0.023	K_{IH}	PAO
77	0.048	b_{MAC}	MET_ACET	110	0.023	K_P	ACID
78	0.047	K_A	PAO	111	0.020	μ_{MH_2}	MET_HID
79	0.046	f_{XI}	MET_HID	112	0.020	f_{AC}	ACET
80	0.045	K_{IH}	MET_HID	113	0.019	$K_{T(Q_{PHA})}$	PAO
81	0.043	K_H	PAO	114	0.019	Y_{MH_2}	MET_HID
82	0.043	K_{H_2}	ACET	115	0.018	K_P	HET
83	0.043	K_H	ACET	116	0.016	f_{PRO}	ACID
84	0.042	μ_{MAC}	MET_ACET	117	0.016	f_{XI}	ACET
85	0.042	K_P	MET_ACET	118	0.015	K_{NO_3}	HID_ACID
86	0.042	K_{ALK}	HET	119	0.014	K_{O_2}	HID_ACID
87	0.042	K_H	MET_ACET	120	0.014	K_H	HET
88	0.041	K_{NO_3}	ACET	121	0.013	$K_{T(bACID)}$	ACID
89	0.041	f_{XI}	PAO	122	0.011	f_{AC}	ACID
90	0.040	K_{Fe}	HET	123	0.010	K_P	MET_HID
91	0.038	K_A	HET	124	0.007	f_{XI}	AUT
92	0.036	$K_{T(\mu_{MH_2})}$	MET_HID	125	0.006	Y_{PRO}	ACET
93	0.036	K_{O_2}	MET_ACET	126	0.005	K_A	MET_ACET
94	0.035	K_H	ACID	127	0.000	$K_{T(bPHA)}$	PAO
95	0.034	$K_{T(\mu_{MAC})}$	MET_ACET	128	0.000	$K_{T(\mu_H)}$	HET
96	0.033	$K_{T(Q_{PP})}$	PAO	129	0.000	$K_{T(\mu_{PRO})}$	ACET
97	0.032	K_{O_2}	PAO	130	0.000	$K_{T(K_H)}$	HID
98	0.032	μ_{PRO}	ACET	131	0.000	K_{NH_4}	ACID
99	0.031	Y_{MAC}	MET_ACET	132	0.000	$K_{T(bPP)}$	PAO
100	0.031	$K_{T(bPAO)}$	PAO	133	0.000	$K_{T(bPRO)}$	ACET
101	0.030	$K_{T(\mu_{PAO})}$	PAO	134	0.000	K_{ALK}	AUT
102	0.029	K_{PRO}	HET	135	0.000	$K_{T(K_X)}$	HID
103	0.028	K_{PP}	PAO	136	0.000	$K_{T(K_H)}$	ACID

PROCESOS. PAO: Bacterias acumuladoras de fósforo; AUT: Bacterias autótrofas; ACID: Bacterias acidogénicas; HET: Bacterias heterótrofas; HID: Hidrólisis; HID_ACID: Hidrólisis de acidogénicas; ACET: Bacterias acetogénicas; MET_ACET: Bacterias metanogénicas acetotróficas; MET_HID: Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas.

En los primeros puestos de la Tabla 59 – A se encuentran principalmente los parámetros del modelo que se calibran mediante ensayos específicos. Se observa en la tabla que los de las bacterias PAO y de las autótrofas se encuentran en esta zona de elevada sensibilidad. El parámetro que más

influye en las variables analizadas es el rendimiento de las bacterias PAO: Y_{PAO} . Así también K_{MAX} , q_{PP} y μ_{PAO} se encuentran en este grupo de parámetros más influyentes del modelo. Esto concuerda con lo observado en el análisis de sensibilidad del ensayo de calibración *off-line* de las bacterias PAO en condiciones aerobias, en el cual los parámetros Y_{PAO} , $K_{MAX}X_{PAO}$, $q_{PP}X_{PAO}$ y $\mu_{PAO}X_{PAO}$ mostraron una elevada sensibilidad.

En la Tabla 59 – A se observa que los parámetros característicos de las bacterias heterótrofas no muestran una influencia importante en las variables analizadas. Se considera que en las condiciones de trabajo las bacterias heterótrofas pueden desarrollarse sin problemas. En edades de fango más pequeñas los parámetros característicos de este tipo de bacterias podrían mostrar una elevada sensibilidad.

En la Tabla 59 – B se recogen los parámetros con valores más bajos de δ_j . Entre éstos se encuentran los que caracterizan el comportamiento de las bacterias acetogénicas, las metanogénicas acetotróficas y metanogénicas hidrogenotróficas. Si bien el modelo BNRM1 considera que estos microorganismos pueden estar presentes en todas las etapas de una EDAR, su desarrollo dependerá de las condiciones ambientales. En este trabajo se ha observado que estas bacterias no influyen en el proceso de fangos activados. Entre los parámetros menos sensibles se encuentran también las constantes de temperatura de los parámetros cinéticos.

Antes de avanzar en el análisis propuesto es conveniente realizar un estudio de las sensibilidades $S_{p_j}^{X_i}$ de los parámetros calibrados en ensayos específicos. Este análisis permitiría establecer sobre qué variables, de las cinco seleccionadas, ejercen mayor influencia los parámetros que se calibran en experimentos *off-line*. En la Tabla 60 se recogen las sensibilidades $S_{p_j}^{X_i}$ de los parámetros de la Tabla 59 – A que se calibran mediante ensayos específicos y que presentan mayor medida de la sensibilidad (δ_j). Se han seleccionado los primeros 9 parámetros para estudiar cómo afectan a las

variables analizadas. El rendimiento Y_{PAO} tiene un efecto muy importante en S_{PO_4} , aunque su influencia es prácticamente nula en las variables restantes. Lo mismo se observa en los parámetros de las bacterias PAO: K_{MAX} , b_{PAO} , q_{PP} y μ_{PAO} . Los parámetros μ_{AUT} y b_{AUT} muestran una gran influencia no sólo en S_{NH_4} sino también en S_{PO_4} y DQO_{SOL} . Se observa así mismo que los parámetros que se recogen en la Tabla 60 no ejercen influencia en la concentración de S_{NO_3} y $N_{TOT SOL}$.

Tabla 60: Sensibilidades $S_{p_j}^{X_i}$ de los parámetros calibrados en ensayos específicos con elevada medida de la sensibilidad δ_j .

Variables	Parámetros								
	Y_{PAO}	μ_{AUT}	K_{MAX}	b_{AUT}	b_{PAO}	Y_{PO_4}	q_{PP}	μ_{PAO}	$K_{NH_4 AUT}$
S_{NH_4}	0.200	-7.614	0.013	5.145	0.064	0.213	0.152	0.071	1.906
S_{NO_3}	-0.028	0.021	-0.001	-0.010	0.020	-0.004	-0.003	0.000	-0.007
S_{PO_4}	-9.408	-1.216	-6.537	0.932	3.914	-2.556	2.339	2.189	0.221
DQO_{SOL}	0.008	0.152	0.003	-0.088	0.000	0.003	-0.003	-0.001	-0.032
$N_{T SOL}$	-0.022	-0.027	0.000	0.022	0.018	-0.002	-0.002	0.001	0.006

En la Tabla 59 – A se observa que determinados parámetros con elevada medida de la sensibilidad, δ_j , no se han calibrado mediante ensayos específicos. Entre estos se encuentran μ_{ACID} y b_{ACID} , velocidad de crecimiento específica y velocidad de muerte de las bacterias acidogénicas, respectivamente. Estas bacterias utilizan materia orgánica fácilmente biodegradable, S_F , y producen AGV (S_A y S_{PRO}) que son consumidos por las bacterias PAO. De esta manera, la actividad de las bacterias acidogénicas influye directamente en el proceso de eliminación biológica de fósforo, razón por la cual estos parámetros resultan tan importantes en las variables analizadas.

El análisis expuesto en los párrafos anteriores ha permitido estudiar la influencia de todos los parámetros en la respuesta del modelo. Sin embargo, el mayor interés se encuentra en el conjunto de parámetros del modelo BNRM1 que no se determinan en los ensayos específicos, puesto que los datos dinámicos de las variables S_{NH_4} , S_{NO_3} , $N_{T SOL}$, S_{PO_4} y DQO_{SOL} podrían emplearse en la calibración de estos parámetros.

Para llevar a cabo el procedimiento de calibración dinámica de los parámetros del modelo BNRM1 que no se cuantifican mediante experimentos *off-line*, se considera que es conveniente determinar:

- a) las variables más sensibles a las perturbaciones de estos parámetros, y
- b) el conjunto de parámetros que sean potencialmente identificables a partir de los datos dinámicos disponibles.

A continuación se expone el análisis realizado.

a. Selección de las variables más sensibles:

Las sensibilidades de los parámetros no calibrados en ensayos específicos con mayor medida de la sensibilidad, δ_j , se muestran en la Tabla 61. Se han incluido los primeros 10 parámetros al considerar que los restantes ejercen muy poca influencia sobre las variables analizadas. De los datos de $S_{p_j}^{X_i}$ es posible observar que S_{PO_4} es muy sensible a las variaciones de todos los parámetros de la tabla. En cambio, S_{NH_4} muestra una elevada sensibilidad respecto de $K_{O_2\text{ AUT}}$ y $K_{NH_4\text{ HET}}$, principalmente. El contenido de DQO_{SOL} sólo presenta una $S_{p_j}^{X_i}$ apreciable respecto de $K_{NH_4\text{ HET}}$. En este caso se repite lo observado en la Tabla 60, las concentraciones de nitratos, S_{NO_3} , y nitrógeno total soluble, $N_{T\text{ SOL}}$, no muestran una sensibilidad apreciable a los parámetros analizados. Datos dinámicos de estas variables no resultan útiles en el procedimiento de calibración dinámica, puesto que no exhiben una variación apreciable ante las perturbaciones de los parámetros. En cambio los variables S_{PO_4} , S_{NH_4} y DQO_{SOL} sí contienen información experimental relevante para el procedimiento de calibración dinámica. Dado que estas variables describen cambios apreciables ante las perturbaciones de los parámetros, se pueden emplear en el procedimiento de calibración dinámica.

Tabla 61: Sensibilidades $S_{p_j}^{X_i}$ de parámetros no calibrados en ensayos específicos.

Variables	Parámetros									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	μ_{ACID}	b_{ACID}	$K_{O_2 HET}$	$K_{O_2 AUT}$	η_{NO_3}	K_{FACID}	$K_{NH_4 HET}$	$K_{PS PAO}$	$K_{NO_3 HID}$	$K_{H HID ACID}$
S_{NH_4}	-0.060	-0.066	0.170	1.610	0.177	0.046	0.553	0.408	0.131	0.220
S_{NO_3}	-0.027	0.023	-0.020	0.002	-0.011	0.006	-0.010	-0.004	0.001	-0.004
S_{PO_4}	-4.932	4.020	-1.809	0.356	-1.410	1.155	-0.475	-0.241	0.370	-0.323
DQO_{SOL}	0.026	-0.019	0.013	-0.029	-0.006	-0.006	0.124	-0.003	0.001	0.010
$N_{T SOL}$	-0.022	0.018	-0.017	0.011	-0.009	0.005	-0.001	-0.001	0.001	-0.001

b. Selección del conjunto de parámetros identificables:

La medida de la sensibilidad, δ_j , permite estudiar el efecto de cada parámetro considerado individualmente sobre las salidas. Sin embargo, esta información no tiene en cuenta la posible existencia de colinealidades entre parámetros, que impide la identificación conjunta de los mismos a partir de los datos experimentales disponibles. Esta problemática se puede estudiar a través del índice de colinealidad, γ_K , (Ec. 18) y la medida del determinante, ρ_K , (Ec. 20), el cual combina la información contenida en δ_j y γ_K , (ver apartado 1.7.2.2).

En este análisis no se han incluido los parámetros $K_{O_2 AUT}$ y $K_{O_2 HET}$. En la zona aerobia del reactor biológico se mantiene la concentración de OD en 2 mg O_2/l , el cual es un valor notablemente superior a las constantes de semisaturación. Por esta razón es posible considerar que las variables S_{PO_4} , S_{NH_4} and DQO_{SOL} no serán influenciadas por dichos parámetros. De esta manera en el análisis posterior se considerarán los parámetros μ_{ACID} , b_{ACID} , η_{NO_3} , K_{FACID} , $K_{NH_4 HET}$, $K_{PS PAO}$, $K_{NO_3 HID}$ y $K_{H HID ACID}$ de la Tabla 61.

Con los valores de $S_{p_j}^{X_i}$ de los parámetros seleccionados se ha calculado el índice de colinealidad, γ_K , y la medida del determinante, ρ_K , para todos los posibles subconjuntos, empezando por los que contienen 2 parámetros. En la Tabla 62 se recogen los valores obtenidos de γ_K y ρ_K de algunos

subconjuntos. Los que contienen los parámetros de las bacterias acidogénicas: 1, 2 y 3 presentan un $\gamma_K > 10$, lo cual indica la existencia de colinealidad entre estos parámetros (Brun y col., 2002). Los subconjuntos 4: $\{\mu_{ACID}, \eta_{NO3\ HID}\}$ y 5: $\{b_{ACID}, \eta_{NO3\ HID}\}$ también presentan colinealidad. En cambio los subconjuntos 6: $\{\mu_{ACID}, K_{NH4HET}\}$ con $\gamma_K=1,7$ y el 7: $\{\mu_{ACID}, K_{NH4HET}, K_{PS\ PAO}\}$ con $\gamma_K = 7,9$ pueden ser identificados a partir de los datos disponibles. Los subconjuntos 8 y 9 resultan de incorporar al 7 el parámetro $K_{NO3\ HID}$ y $K_{H\ HID\ ACID}$, respectivamente. Ambos muestran una colinealidad muy pronunciada.

Tabla 62: γ_K y ρ_K para algunos subconjuntos de parámetros.

Número del subconjunto	Parámetro	γ_K	ρ_K
1	$\mu_{ACID}; b_{ACID}$	49.2	0.8
2	$\mu_{ACID}; K_{F\ ACID}$	51.2	0.4
3	$b_{ACID}; K_{F\ ACID}$	25.1	0.5
4	$\mu_{ACID}; \eta_{NO3\ HID}$	10.3	1.0
5	$b_{ACID}; \eta_{NO3\ HID}$	13.0	0.8
6	$\mu_{ACID}; K_{NH4\ HET}$	1.7	1.7
7	$\mu_{ACID}; ; K_{NH4\ HET}; K_{PS\ PAO}$	7.9	0.6
8	$\mu_{ACID}; ; K_{NH4\ HET}; K_{PS\ PAO}; K_{NO3\ HID}$	827.0	0.1
9	$\mu_{ACID}; ; K_{NH4\ HET}; K_{PS\ PAO}; K_{H\ HID\ ACID}$	571.2	0.1

Si bien los subconjuntos 6 y 7 son potencialmente identificables, el valor tan bajo de ρ_K del subconjunto 7 indica una moderada interdependencia entre los parámetros así como una menor influencia en la respuesta del modelo.

4.3.2.4 Caracterización dinámica

El procedimiento de caracterización dinámica consiste en la determinación de la evolución temporal de las variables del influente y del efluente para conocer la curva de variación diaria. El muestreo dinámico se lleva a cabo en el período sin lluvias, con la planta funcionando en estado estable.

En este trabajo se ha muestreado el influente y el efluente con un equipo programable que permite tomar una muestra cada hora hasta completar las 24. La primera muestra del influente se tomó a las 16 horas y el inicio de la

toma de muestras del efluente se realizó un período posterior igual al TRH de la planta. De esta manera es posible caracterizar el influente y su efluente correspondiente, que sale de la planta cuando ha pasado un período igual al TRH.

El procedimiento de caracterización ha permitido determinar las fracciones S_A , S_F , S_I , X_S , X_I , S_{PO_4} , S_{NH_4} y S_{NO_3} . Para la determinación de las diferentes componentes de materia orgánica del influente se ha realizado una caracterización físico-química empleando un tamaño de filtro de $0.1 \mu m$. Para esto se ha determinado la concentración de: AGV, DQO_{SOL} , $DBO_{SOL L}$, DQO_{TOT} y $DBO_{TOT L}$ del influente y la DQO_{TOT} , y DQO_{SOL} del efluente. La $DBO_{SOL L EF}$ se ha tomado de datos históricos del efluente obteniéndose un valor de $DBO_{SOL L} = 2 \text{ mg DQO/l}$. También se han analizado los SST y los SSV del influente. En el Anejo I se recogen todos los datos obtenidos para llevar a cabo el procedimiento de calibración dinámica.

En la Figura 65 se muestran los datos de S_{NH_4} , S_{PO_4} y S_{NO_3} del influente. Si bien S_{PO_4} y S_{NO_3} no describen importantes variaciones diarias, S_{NH_4} presenta un comportamiento diferente. Desde las 16:00 horas la concentración de S_{NH_4} disminuye suavemente hasta las 08:00 horas. En este momento se produce un aumento importante de la concentración de S_{NH_4} en el influente, siendo máxima hacia las 12:00 horas.

En la Figura 66 se presentan las fracciones solubles de materia orgánica: S_F , S_I y S_A . Esta última es la suma de los AGV del influente y los añadidos con el alimento. Si bien la fracción S_I no describe una variación notable, las fracciones S_F y S_A sí muestran cambios importantes. S_F presenta concentraciones elevadas al inicio del muestreo. Sin embargo, describe una disminución paulatina hasta las 08:00 horas momento en el cual comienza a incrementarse nuevamente. S_A también muestra una variación importante. Presenta un valor máximo a las 20:00 horas con una suave disminución que se prolonga hasta las 12:00 horas. En este período del día la concentración

de AGV es muy pobre si se considera que el alimento añadido tiene un contenido de $S_A = 76$ mg DQO/l.

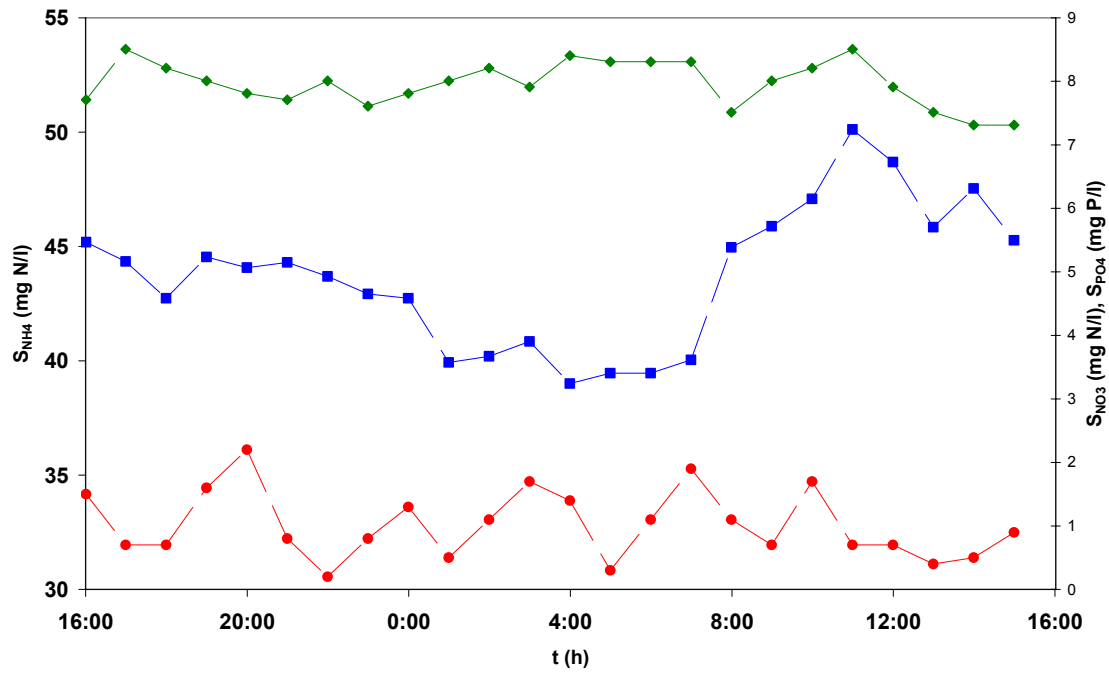


Figura 65: S_{NH_4} (—■), S_{NO_3} (—●) y S_{PO_4} (—◆) del influente.

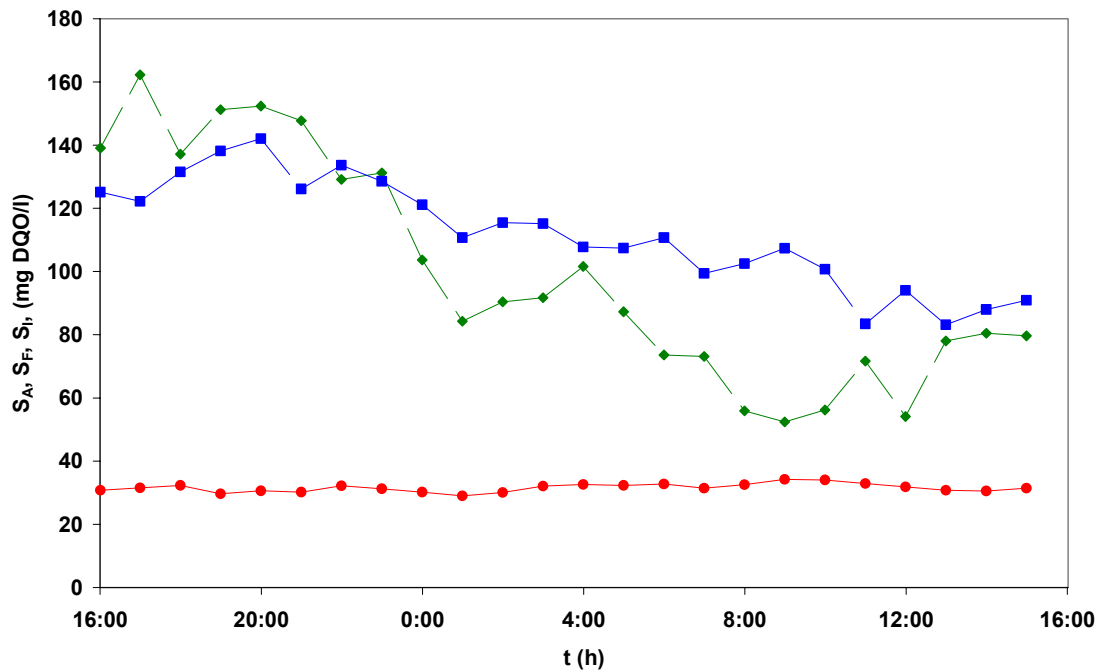


Figura 66: S_F (—◆), S_A (—■) y S_I (—●) del influente.

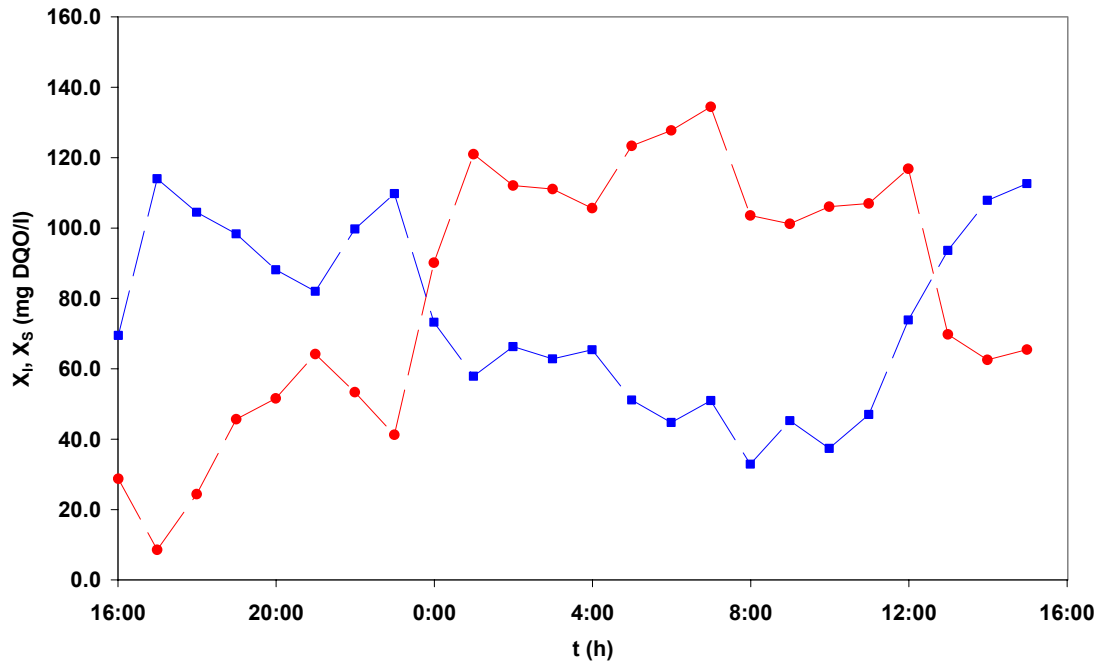


Figura 67: X_I (—■) y X_S (—●) del influente.

La evolución de las fracciones X_S y X_I se muestra en la Figura 67, las cuales describen importantes variaciones diarias. X_S presenta un aumento desde las 16:00 horas que se prolonga hasta las 00:00 horas. Desde este momento se mantiene estable hasta las 12:00 horas que es cuando disminuye la concentración de esta fracción en el influente. En cambio la componente X_I describe una disminución suave hasta alcanzar el valor mínimo a las 12 horas. En este momento se produce un aumento notable del contenido de X_I en el influente. Se observa que el comportamiento de ambas fracciones es opuesto durante el día.

De todo lo anterior se deduce que la calidad del agua residual varía en forma apreciable durante el día. Es importante destacar que la EDAR de Carraixet realiza un servicio de depuración de un área muy amplia abarcando diferentes poblaciones y sus respectivos polígonos industriales. De esta manera el influente que entra a esta depuradora tiene una componente industrial importante. Cabe recordar que la toma del influente se realizó en

la arqueta de salida del decantador primario de la EDAR el cual tiene un TRH aproximado de 2 horas. Es decir, incorpora una modificación a la calidad del agua residual que entra a la EDAR y que al ser agua decantada se ha eliminado una parte importante de la componente particulada. En general se observa que desde las 16:00 hasta las 24:00 horas entra un influente rico en S_F y X_I y muy pobre en X_S . La elevada concentración de estas fracciones indica una importante actividad tanto urbana como industrial. Durante el resto del día entra un agua residual más rica en X_S lo cual puede corresponder a una actividad principalmente doméstica.

Estos datos dinámicos se incorporaron en el simulador DESASS para proceder a la calibración dinámica. En el apartado siguiente se describe el procedimiento desarrollado.

4.3.2.5 Etapa N°4: Calibración dinámica

En esta etapa se lleva a cabo el procedimiento de calibración dinámica de los parámetros seleccionados de acuerdo al análisis de sensibilidad del proceso en estado estacionario.

Para realizar el procedimiento de calibración dinámica de los parámetros se han seguido los siguientes pasos:

- 1- Se considera como estado inicial, a partir del cual realizar la simulación dinámica, el estado estacionario simulado en la etapa N° 2, el mismo que se empleó en el análisis de sensibilidad del sistema.
- 2- Se incorporan en el programa DESASS los datos dinámicos del influente. En una planilla de cálculo se introducen los datos experimentales de las fracciones solubles y particuladas del influente descritos en el apartado anterior.
- 3- Se simula el comportamiento de la planta empleando los parámetros calibrados en los ensayos *off-line*, (ver Tabla 56).
- 4- Se emplean las variables más sensibles, las cuales muestran cambios

apreciables ante las variaciones de los parámetros, (S_{NH_4} , S_{PO_4} y DQO_{SOL} del efluente), para ajustar los parámetros. De acuerdo al análisis de sensibilidad estas variables contienen información experimental relevante.

- 5- Se ajustan los parámetros seleccionados en el análisis de sensibilidad del sistema en estado estacionario. De los resultados obtenidos el subconjunto 6 formado por μ_{ACID} y $K_{NH_4 HET}$, con un $\gamma_K=1,7$ es potencialmente identificable a partir de los datos dinámicos disponibles. Para llevar a cabo este ajuste se comparan los datos experimentales de S_{NH_4} , S_{PO_4} y DQO_{SOL} del efluente con los valores predichos por el modelo. Se modifican estos parámetros hasta minimizar la suma del error cuadrático entre los datos experimentales y simulados.
- 6- Si se logra un ajuste adecuado de los datos experimentales se considera finalizado el procedimiento de calibración del modelo BNRM1.

De igual manera que en el apartado 4.3.2.2, se observó que al considerar la fracción X_I de cada muestra obtenida con el método de caracterización físico-químico los valores de la DQO_{TOT} de los reactores predichos por el modelo eran superiores a los datos experimentales. Por esta razón, en la simulación dinámica, se ha considerado una fracción constante de $X_I = 26$ mg DQO/l durante todo el período para lograr similitud entre los datos experimentales y los predichos por el modelo de la DQO_{TOT} de los reactores.

El modelo BNRM1 propone un valor de $\mu_{ACID} = 2.2$ d^{-1} y de $K_{NH_4 HET} = 0.05$ mgN/l. Sin embargo, en el procedimiento de simulación en estado estacionario se consideró apropiado el empleo de un valor más bajo de $\mu_{ACID}=1.8$ d^{-1} para lograr datos similares a los experimentales. El comportamiento dinámico del proceso se simuló con estos valores de μ_{ACID} y $K_{NH_4 HET}$ y los parámetros calibrados en los ensayos específicos. Posteriormente se compararon los datos experimentales de S_{NH_4} , S_{PO_4} y

DQO_{SOL} del efluente con los valores simulados de estas variables, las cuales han sido seleccionadas del análisis de sensibilidad. La Figura 68 muestra el resultado de la simulación y los datos experimentales de estas variables. La línea discontinua representa la respuesta del modelo con los valores $\mu_{\text{ACID}}=1.8 \text{ d}^{-1}$ y $K_{\text{NH}_4 \text{ HET}}=0.05 \text{ mgN/l}$. De las tres variables, solamente S_{NH_4} es representada en forma adecuada por el modelo. Para lograr que los datos simulados describan el comportamiento real de S_{PO_4} y DQO_{SOL} se modificaron los parámetros seleccionados del análisis de sensibilidad del sistema en estado estacionario. La modificación se realizó hasta lograr un mínimo en el error cuadrático medio entre los datos experimentales y simulados. Los valores de los parámetros que permitieron alcanzar este mínimo han sido $\mu_{\text{ACID}}=0.97 \text{ d}^{-1}$ y $K_{\text{NH}_4 \text{ HET}} = 0.25 \text{ mgN/l}$. La respuesta del modelo con estos valores está representada mediante la línea continua en cada gráfica de la Figura 68.

La representación adecuada de los datos de S_{PO_4} se logró disminuyendo la velocidad específica μ_{ACID} lo cual produce una menor disponibilidad de S_{A} en el medio. Esta disminución deteriora el proceso de eliminación de fósforo generando un aumento en la concentración de este compuesto en el efluente. Cabe destacar que la modificación de la velocidad específica únicamente afecta al contenido de S_{PO_4} , (ver Tabla 61).

En la concentración de DQO_{SOL} se produce un aumento notable entre las 12:00 y las 20:00 horas. En este período el contenido de amonio en el efluente es muy bajo generando una limitación de este nutriente para ser utilizado por las bacterias heterótrofas. Al aumentar $K_{\text{NH}_4 \text{ HET}}$ disminuye el valor de la función “switch” controlada por este parámetro. De esta manera cuando la concentración de S_{NH_4} alcanza valores muy bajos, disminuye la velocidad de crecimiento de las bacterias heterótrofas y aumenta el contenido de materia orgánica rápidamente biodegradable en el efluente.

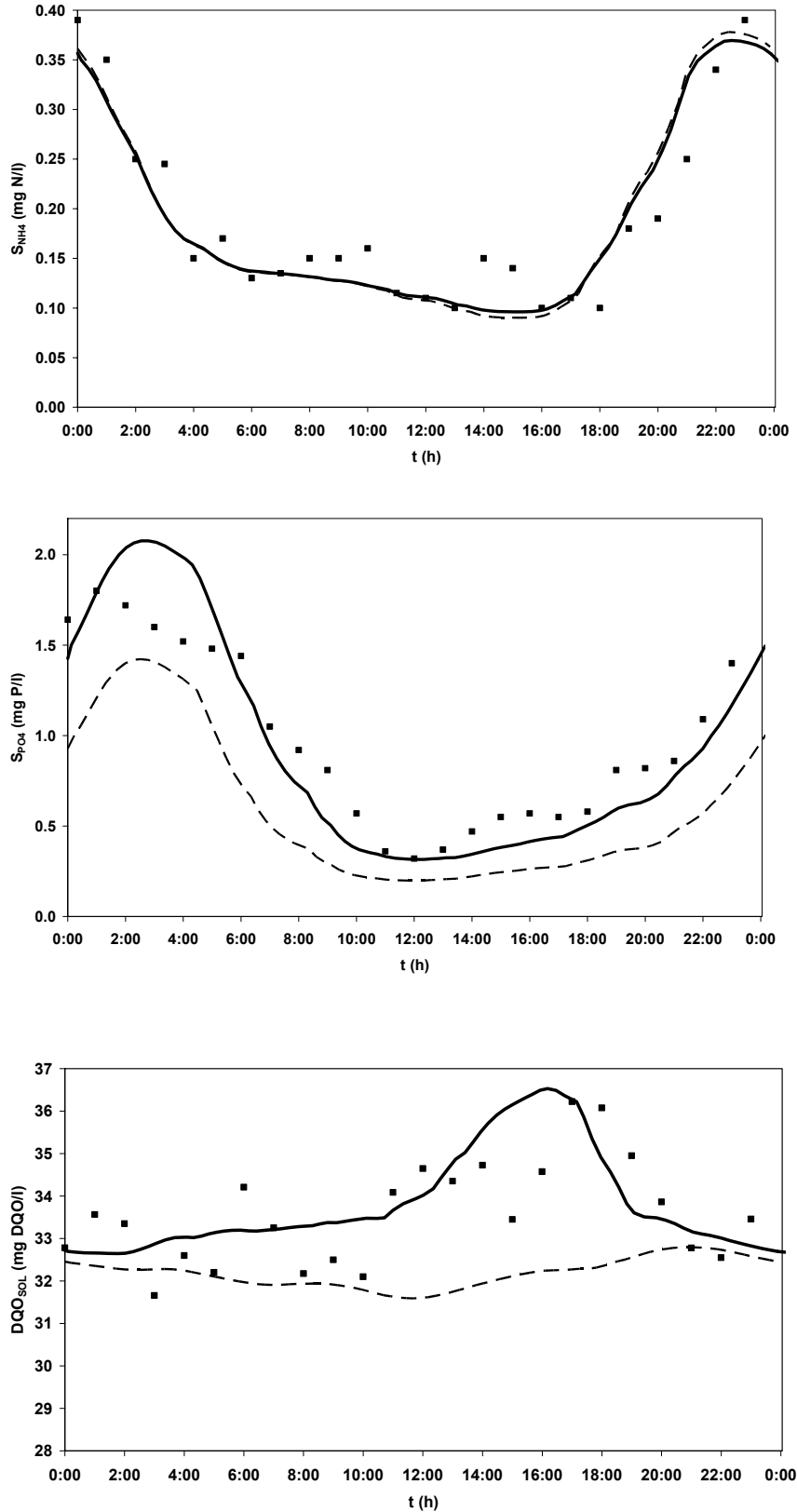


Figura 68: Datos de S_{NH_4} , S_{PO_4} y DQO_{sol} del efluente. (■) experimental; (—) simulado con $\mu_{ACID}=1.8 d^{-1}$ y $K_{NH_4 HET} = 0.05 mgN/l$; (- -) simulado con $\mu_{ACID}=0.97 d^{-1}$ y $K_{NH_4 HET} = 0.25 mgN/l$.

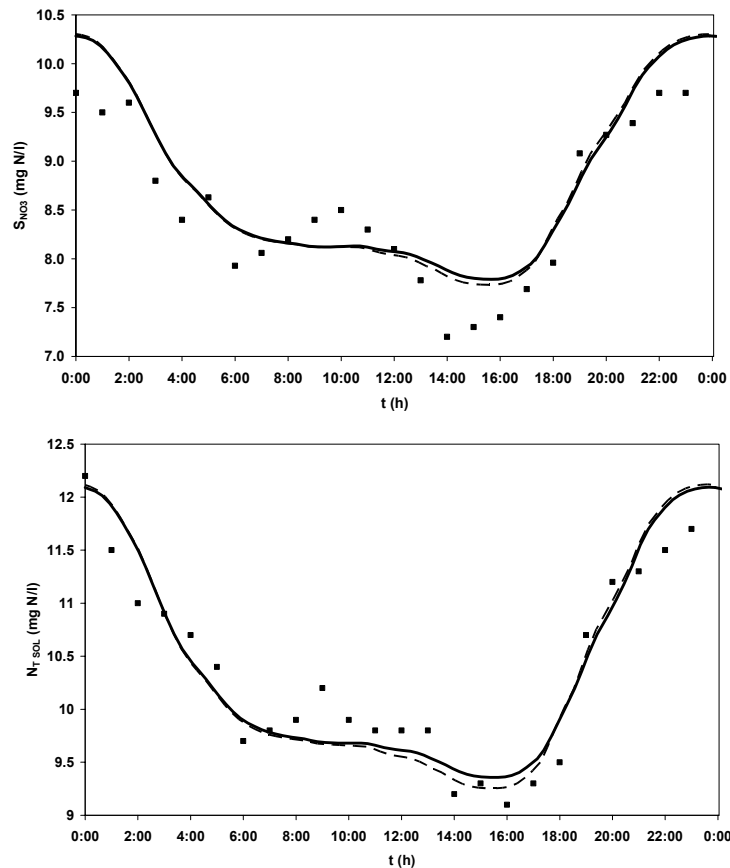


Figura 69: Datos de S_{NO_3} y $N_{T\ SOL}$ del efluente. (■) experimental; (---) simulado con $\mu_{ACID}=1.8\ d^{-1}$ y $K_{NH_4HET}=0.05\ mgN/l$; (—) simulado con $\mu_{ACID}=0.97\ d^{-1}$ y $K_{NH_4HET}=0.25\ mgN/l$.

En las gráficas de la Figura 69 se muestran los datos experimentales de S_{NO_3} y $N_{T\ SOL}$ y los simulados con los valores de los parámetros antes y después del ajuste. Se observa que el modelo predice en forma adecuada el comportamiento de estas variables. La modificación de los parámetros no produjo una variación notable en los datos simulados, lo cual confirma que S_{NO_3} y $N_{T\ SOL}$ no son sensibles a las perturbaciones de estos parámetros.

Al modificar los parámetros μ_{ACID} y $K_{NH_4\ HET}$ seleccionados a partir del análisis de sensibilidad el modelo logró describir en forma adecuada los datos experimentales de S_{PO_4} y DQO_{SOL} del efluente. No ha sido necesario recurrir a otros parámetros como $K_{PS\ PAO}$ para lograr una mejor predicción

de los datos. De esta manera es posible considerar finalizado el procedimiento de calibración dinámica.

De los resultados obtenidos en esta etapa se pueden derivar las siguientes conclusiones:

1) Los parámetros de las bacterias acidogénicas ejercen una gran influencia en el proceso de eliminación de fósforo. Estos microorganismos pueden modificar notoriamente la actividad de las bacterias PAO al producir una concentración adicional de ácidos grasos volátiles. De los tres parámetros más sensibles de estas bacterias: μ_{ACID} , b_{ACID} y K_{FACID} el primero de ellos se calibró a partir de los datos dinámicos. Los dos restantes al presentar una pronunciada colinealidad no han podido ser identificados en este procedimiento. Por esta razón se han empleado los siguientes valores propuestos por el modelo BNRM1: $b_{ACID}=0.33 \text{ d}^{-1}$ y $K_{FACID} = 15 \text{ mg DQO/l}$.

2) Con el valor de $\mu_{ACID} = 0.97 \text{ d}^{-1}$ fue posible describir la variación real de la concentración de S_{PO_4} del efluente. El valor de este parámetro es relativamente bajo si se compara con las velocidades de crecimiento de las bacterias autótrofas, heterótrofas y PAO. Blanco, (2005) halló un valor de μ_{ACID} de 5.0 d^{-1} a partir de ensayos en laboratorio empleando elevadas concentraciones de glucosa como sustrato. Bouzas, (2003), mediante la simulación del proceso de fermentación obtuvo un valor de $\mu_{ACID} = 0.98 \text{ d}^{-1}$ y Ribes, (2005), un valor de $\mu_{ACID} = 1.0 \text{ d}^{-1}$. Estos últimos valores son similares al obtenido en este trabajo a partir de los datos dinámicos.

3) El análisis de sensibilidad en estado estacionario es una herramienta muy importante en el procedimiento de calibración dinámica al permitir determinar el conjunto de parámetros potencialmente identificables. La importancia de dicho análisis se ha podido comprobar en este trabajo puesto que al modificar los parámetros seleccionados el modelo fue capaz de describir los datos experimentales de S_{PO_4} y DQO_{SOL} .

4) El contenido de S_{NH_4} del efluente es el resultado principalmente del proceso de nitrificación el cual está representado por los parámetros de las bacterias autótrofas: μ_{AUT} , $K_{NH_4 AUT}$ y b_{AUT} . Si estos parámetros se obtienen en forma adecuada entonces será posible describir el comportamiento real de la variable S_{NH_4} del efluente. En este trabajo se ha observado que los datos simulados de S_{NH_4} son muy similares a los datos experimentales de esta variable. Esto indica que la identificación de los parámetros de las bacterias autótrofas determinados mediante ensayos de calibración *off-line* ha sido adecuada.

5) El modelo ha sido capaz de predecir el comportamiento de las variables S_{NO_3} y $N_{T SOL}$, lo cual indica la bondad del procedimiento de calibración *off-line* de los parámetros que controlan el proceso de desnitrificación.

6) El procedimiento propuesto se basa principalmente en una metodología de calibración *off-line* de los parámetros más sensibles del modelo BNRM1. En estos ensayos específicos de laboratorio las condiciones pueden ser controladas en forma adecuada. Incluso si se realiza un muestreo exhaustivo de acuerdo a los resultados del análisis de sensibilidad de estos experimentos, es posible mejorar la identificación de los parámetros que se determinan en estos ensayos. Finalmente, los datos dinámicos permiten completar el proceso de calibración. Estos datos se destinan a la identificación del conjunto de parámetros potencialmente identificables que no se determinan en experimentos *off-line*.

4.4 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS CALIBRADOS EN EXPERIMENTOS *OFF-LINE*

Este apartado se ha destinado a realizar un análisis de los parámetros calibrados en los experimentos de laboratorio en las tres edades de fango.

4.4.1 *Parámetros calibrados en los experimentos off-line*

En los tres períodos de trabajo de la planta piloto se realizaron una serie de experimentos *off-line* que permitieron la identificación de un conjunto de parámetros. El propósito de este apartado es comparar los valores obtenidos con esta metodología.

En la Tabla 63 se recogen todos los valores de los parámetros calibrados mediante ensayos específicos en las diferentes edades de fango. Los parámetros se han agrupado en función del proceso que controlan. A continuación se realizará una breve discusión de cada grupo.

Tabla 63: Parámetros calibrados en los distintos TRC estudiados.

	Parámetros	TRC		
		6.5 días	8 días	9 días
HET	μ_H	2.00	2.08	2.00
	K_F	1.3	1.1	0.47
	b_H	0.40	0.40	0.40
	Y_H	0.61	0.58	0.60
	η_H	0.13	0.19	0.37
AUT	μ_{AUT}	1.3	1.2	1.2
	K_{NH_4}	0.20	0.24	0.29
	b_{AUT}	0.20	0.20	0.20
PAO	μ_{PAO}	2.7	2.7	2.7
	b_{PAO}	0.20	0.20	0.20
	q_{PP}	3.04	3.00	3.08
	K_{PHA}	0.070	0.071	0.070
	K_{MAX}	0.33	0.33	0.30
	K_{IPP}	0.026	0.026	0.026
	Y_{PAO}	0.79	0.79	0.79
	K_A	1.00	1.00	1.00
	Q_{PHA}	3.60	3.60	3.67
	Y_{PO_4}	0.46	0.35	0.35
	η_{PP}	0.48	0.46	0.49
	η_{PAO}	0.27	0.31	0.32

4.4.1.1 *Bacterias heterótrofas:*

Se observa que en el rango de edades estudiadas algunos de los parámetros calibrados de estos microorganismos muestran una pequeña variación. Si bien la velocidad de crecimiento se ha mantenido relativamente estable en el rango estudiado, la constante de semisaturación presenta una disminución al aumentar la edad de fango del proceso. La constante de semisaturación obtenida en este trabajo es más pequeña que la propuesta por el modelo BNRM1 que considera una $K_F=4$ mgDQO/l. El parámetro estequiométrico Y_H es similar al valor $Y_H = 0.63$ mg DQO/mg DQO propuesto por el modelo BNRM1 en los tres TRC. En relación al factor de eficacia de la desnitrificación, se ha observado un significativo incremento de dicho parámetro al aumentar la edad de fango, lo cual indicaría una mayor presencia de bacterias heterótrofas desnitrificantes en el sistema. Cuando la edad del fango es elevada existe una mayor proporción de microorganismos muertos que liberan al medio S_{NH_4} como resultado de la lisis celular. Este amonio adicional en el licor mezcla es oxidado por las bacterias autótrofas favoreciendo las condiciones anóxicas, lo cual beneficia la proliferación de biomasa desnitrificante. Por otro lado, la relación C/N en el influente puede influir notablemente en el proceso de desnitrificación. En la Tabla 64 se muestran los datos de S_{NH_4} , la fracción S_F del influente y S_F/S_{NH_4} en cada TRC. En cada período de trabajo la nitrificación ha sido prácticamente total, con lo cual todo el amonio que ha entrado a la planta piloto ha sido convertido a nitratos. Se observa un incremento notable de este cociente a medida que aumenta el TRC empleado lo cual puede haber favorecido también el proceso de desnitrificación.

Tabla 64: Relación S_F / S_{NH_4} del influente.

	TRC		
	6.5 días	8 días	9 días
S_{NH_4}	30.1	26.4	40.2
S_F	35	40	92
S_F / S_{NH_4}	1.16	1.52	2.29

4.4.1.2 Bacterias autótrofas:

Los parámetros característicos de estas bacterias muestran una variación en el rango de trabajo. La velocidad de crecimiento μ_{AUT} disminuye al incrementar el TRC, mientras que la constante de semisaturación describe un aumento, mostrando una menor afinidad por el amonio. El modelo BNRM1 propone un valor de $\mu_{\text{AUT}} = 1.0 \text{ d}^{-1}$ y una $K_{\text{NH}_4} = 1.0 \text{ mg N/l}$. Si bien el valor de la velocidad de crecimiento es similar al obtenido en este trabajo, la constante de semisaturación es notablemente superior a los valores de K_{NH_4} en cada edad de fango. Experimentalmente se ha observado que estos microorganismos son sensibles al TRC empleado, siendo favorecidos por edades de fango elevadas. Sin embargo, en este trabajo la nitrificación se desarrolló en forma adecuada en las tres edades de fango puesto que en cada período se ha observado una concentración de S_{NH_4} en el efluente del orden de 0.2 mg N/l .

La importancia de una adecuada identificación de los parámetros de las bacterias autótrofas se ha visto reflejada en el análisis de sensibilidad del proceso en estado estacionario. La velocidad de crecimiento y lisis celular muestran una elevada influencia en la respuesta del modelo.

4.4.1.3 Bacterias PAO:

Conforme al análisis de sensibilidad en estado estacionario, algunos de los parámetros que describen el comportamiento de estas bacterias presentan una elevada influencia en la respuesta del modelo. El rendimiento Y_{PAO} es el parámetro que más influye de acuerdo al orden de medidas de sensibilidad, δ_j . El valor obtenido de $Y_{\text{PAO}} = 0.79 \text{ mg DQO/mg DQO}$ se mantiene constante en las tres edades de fango. Este valor es superior al propuesto por el modelo BNRM1: $Y_{\text{PAO}} = 0.63 \text{ mgDQO/mgDQO}$. García Usach, (2002) observó que los valores elevados de Y_{PAO} indican la presencia de bacterias GAO en el fango.

K_{MAX} representa la relación máxima de almacenamiento de polifosfato por unidad de biomasa PAO. Este parámetro también describe una elevada sensibilidad de acuerdo al análisis de sensibilidad en el estado estacionario. K_{MAX} presenta una ligera disminución entre el TRC de 8 días y el de 9 días. Experimentalmente se ha relacionado la presencia de bacterias GAO en el sistema con valores bajos de este parámetro. En presencia de bacterias GAO, no toda la biomasa considerada como PAO puede almacenar fósforo, con lo cual el rendimiento K_{MAX} será inferior al valor obtenido si no hubiese bacterias GAO. El modelo BNRM1 propone un valor de $K_{MAX} = 0.34$ mg P/mg DQO, similar a los obtenidos en este trabajo.

El parámetro μ_{PAO} también presenta una elevada influencia de acuerdo al análisis de sensibilidad en estado estacionario. En las tres edades de fango, se obtuvo una velocidad de crecimiento $\mu_{PAO} = 2.7$ d⁻¹, la cual es notablemente superior a $\mu_{PAO} = 1.0$ d⁻¹, valor propuesto por el modelo BNRM1.

En general los parámetros del modelo que poseen una elevada sensibilidad prácticamente no muestran variación en las tres edades de fango (ver Tabla 63). Sin embargo, el parámetro Y_{PO4} que posee una elevada influencia en la respuesta del modelo describe una variación importante. En el TRC de 6.5 días se observa un valor notablemente superior. El parámetro Y_{PO4} representa el fósforo liberado en condiciones anaerobias por S_A consumida en unidad de DQO. Las bacterias GAO acumulan S_A para formar X_{PHA} sin liberar fósforo al medio, con lo cual un valor bajo de Y_{PO4} indicaría la presencia de bacterias GAO en el proceso. El modelo BNRM1 propone un valor de $Y_{PO4} = 0.4$ mg P/mg DQO, el cual es bastante próximo a los obtenidos en este trabajo.

El factor de eficacia η_{PAO} presenta una importante variación con las diferentes condiciones de trabajo. Este factor describe el consumo de nitratos por crecimiento de las PAO desnitrificantes respecto al consumo de oxígeno por crecimiento. El parámetro η_{PAO} muestra un aumento cuando se

incrementa el valor de TRC, lo cual indica una mayor presencia de bacterias PAO con la capacidad de desnitrificar. Este comportamiento es similar al observado en las bacterias heterótrofas desnitrificantes.

Del análisis de los valores de los parámetros se deduce que ocurre un aumento de la población de bacterias GAO a medida que aumenta la edad de fango del proceso. Se ha observado una notable disminución del parámetro Y_{PO_4} entre el TRC de 6.5 días y el de 8 días, lo cual sugiere que en los períodos de trabajo con una edad de fango de 8 y 9 días la concentración de bacterias GAO es superior. Además, se ha observado que el parámetro K_{MAX} presenta una disminución entre las edades de fango de 8 y 9 días. Este resultado indica que el proceso de eliminación de fósforo ha sufrido un mayor deterioro en el TRC de 9 días dado que los microorganismos presentan una menor capacidad de acumular el fósforo.

Para profundizar el análisis realizado del proceso de eliminación de fósforo, se han estudiado los polihidroxicanoatos producidos en condiciones anaerobias. Además, se ha llevado a cabo un seguimiento microbiológico del fango en los tres períodos de trabajo. A continuación se exponen los resultados obtenidos.

4.4.2 Producción de polihidroxicanoatos en condiciones anaerobias

En ausencia de oxígeno y nitratos las bacterias PAO y GAO consumen ácido acético almacenándolo como polihidroxicanoatos. Se ha observado que la composición y producción de estos polímeros permite determinar si en el licor mezcla existe un aumento de la población de bacterias GAO. Por esta razón se ha destinado este apartado a analizar los polihidroxicanoatos producidos en cada una de las edades de fango.

En la Tabla 65 se recogen los rendimientos PHA/S_A , PHB/S_A y PHV/S_A (mol C/mol C). Estos rendimientos representan los moles de C de PHA, PHB y

PHV producidos por mol de C de ácido acético consumido en condiciones anaerobias, respectivamente. Se observa que PHA/S_A no cumple la relación propuesta por el modelo BNRM1. En este trabajo se obtuvo un rendimiento aproximado de 1.4 mol C/mol C. En la literatura se han hallado valores similares: 1.3 mol C/mol C (Smolders y col., 1994), 1.48 mol C/mol C (Pereira y col., 1996) y 1.3-1.36 mol C/mol C (Yagci y col., 2003). Los rendimientos obtenidos en este trabajo respaldan a los modelos que consideran al glucógeno una fuente importante de poder reductor.

Es posible observar un ligero aumento de la producción de PHA al aumentar el TRC. Experimentalmente se ha determinado que existe una relación entre esta producción y la proporción S_{PO_4}/S_A del influente. Yagci y col., (2003) observaron que al disminuir la relación S_{PO_4}/S_A ocurre un incremento en la producción PHA/S_A . Por otro lado, Liu y col., (1997) determinó que una disminución gradual de la relación S_{PO_4}/S_A entre 20/100 a 2/100 genera un aumento significativo de bacterias GAO. La proporción S_{PO_4}/S_A del influente determina la competición entre las bacterias PAO y GAO basada en la energía interna. La condición promedio en la cual se trabajó en la planta piloto en cada TRC se detalla en Tabla 66. La edad de fango de 6.5 días no favorece el desarrollo de bacterias GAO, por lo cual se considerarán las dos edades restantes. Entre las edades de fango de 8 y 9 días disminuye ligeramente la proporción del influente S_{PO_4}/S_A . Esto puede haber favorecido, además del incremento del TRC del sistema, el aumento del rendimiento PHA/S_A inducido por un aumento de las bacterias GAO entre estas dos edades de fango.

En la Tabla 65 se observa una disminución de la producción de PHB y un incremento en la de PHV al aumentar la edad de fango. Cuando la fuente principal de AGV es el ácido acético se ha observado que las bacterias PAO producen en mayor proporción PHB y una pequeña proporción de PHV (< 10%), (Pijuan y col., 2004). En cambio, las bacterias GAO producen mayor cantidad de PHV (Liu y col., 1996; Filipe y col., 2001a) que los

microorganismos acumuladores de fósforo cuando el principal alimento es ácido acético.

Tabla 65: Producción de polihidroxicanoatos en condiciones anaerobias.

	TRC		
	6.5 días	8 días	9 días
PHA/S _A	1.40	1.41	1.44
PHB/S _A	1.20	1.16	1.06
PHV/S _A	0.20	0.27	0.37
% PHB	85	82	73
% PHV	14	19	26

Tabla 66: Datos medios de S_{PO4} y S_A y cociente S_{PO4}/S_A en cada TRC.

	TRC		
	6.5 días	8 días	9 días
S _{PO4}	9.4	13.0	8.5
S _A	130	136	105
S _{PO4} /S _A	0.07	0.10	0.08

El aumento en la producción total de PHA por unidad de ácido acético consumido como así también la variación de la composición de los polihidroxicanoatos producidos indica un aumento en la concentración de las bacterias GAO en el sistema a medida que se incrementa la edad de fango. Estos datos respaldan los valores de los parámetros calibrados en los experimentos *off-line* los cuales también indican que a medida que aumenta el TRC del proceso se incrementa la proporción de bacterias GAO presentes en el licor mezcla.

4.4.3 Análisis microbiológico del fango

En cada uno de los períodos de trabajo se realizaron análisis periódicos del fango biológico mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Esta técnica permite identificar bacterias que pertenecen a un grupo taxonómico

específico (especie, género, clase, etc.). Se utilizan sondas 16S rARN (ácido ribonucleico) marcadas con fluorocromos, que se unen a la secuencia de rARN de la bacteria deseada, produciendo una fluorescencia en las bacterias hibridadas.

El análisis FISH permite detectar determinadas secuencias de oligonucleótidos en las células. Estas técnicas se basan en la aplicación de los procesos de hibridación que se producen entre secuencias complementarias de material genético. La doble hélice de ADN (ácido desoxirribonucleico) puede ser desnaturalizada, es decir, se desenrolla y se separan las hebras que la forman, mediante la aplicación de una elevada temperatura. Cuando la temperatura disminuye, las hebras se vuelven a unir por sus bases complementarias. Una secuencia de ADN se puede unir a otra de ADN o también a una secuencia de ARN complementaria, produciéndose un híbrido ADN-ADN, o ADN-ARN. De esta manera una secuencia de ADN o de ARN de cadena simple, complementaria de la secuencia de interés, también llamadas sondas, puede utilizarse para identificar con gran precisión la presencia de la secuencia en preparaciones de ADN, ARN. La sonda, está marcada de forma que los híbridos formados sean fácilmente detectables.

Lo más importante de este método es su casi absoluta especificidad, que ningún otro método de identificación es capaz de alcanzar. Para que una sonda sea específica, debe hibridar con su diana, pero no con las otras cadenas de ácidos nucleicos de la muestra. La especificidad varía con la extensión de la cadena y las condiciones de hibridación, por lo que es posible ajustar dicha especificidad a diferentes niveles filogenéticos.

Mediante la técnica FISH es posible verificar la existencia de una especie determinada de bacteria en nuestras muestras. Para entender la especificidad de la técnica conviene conocer ligeramente la clasificación taxonómica, y el lugar que ocupa la bacteria "diana" en ella. De acuerdo con la clasificación, si se dispone de la sonda específica, se puede identificar la

presencia de la bacteria “diana” en una muestra. La diana es la cadena de ARN o ADN que se puede detectar utilizando la sonda. Estas secuencias pueden localizarse en cromosomas, en plásmidos, en ribosomas y mitocondrias. Ciertas regiones de los ribosomas se encuentran en todos los seres vivos, otras son comunes a todas las bacterias, y unas pocas se hallan en los miembros del mismo género o especie, lo que permite utilizar la estructura ribosómica para determinar la taxonomía bacteriana.

El análisis FISH se implementó de acuerdo a la técnica descrita por Manz (1992). En primer lugar se emplearon sondas EUBmix marcadas con FAM específicas para el dominio Bacteria. Esta prueba se llevó a cabo con proporciones iguales de las sondas EUB338, EUB338 I y EUB338 II (Amman y col., 1990; Daims y col., 1999). La presencia de bacterias PAO en el fango biológico se determinó mediante sondas PAOmix marcadas con TAMRA específicas para *Accumulibacter*. Esta prueba se llevó a cabo con iguales proporciones de las sondas PAO462, PAO651 y PAO846 (Crocetti y col., 2000). Finalmente, la presencia de bacterias GAO se determinó por medio de sondas GAOmix y DEFmix. Las sondas GAOmix son específicas para *Competibacter*, marcadas con TAMRA (GAOQ431 y GAOQ989) (Crocetti y col., 2002). Las sondas DEFmix marcadas con TAMRA, son específicas para *Deffluvicoccus* relativa a bacterias GAO. Esta última prueba se realizó con cantidades iguales de las sondas TFO_DF218 y TFO_DF618, (Wong y col., 2004). En la Tabla 67 se describen las características de las sondas empleadas. Los resultados de las pruebas FISH se examinaron con un microscopio de epifluorescencia Leica DM2500. Se obtuvieron 20 imágenes de cada muestra las cuales se emplearon para cuantificar los porcentajes de las bacterias PAO y GAO presentes en las mismas. La metodología empleada se describe en Barat y col., (2008). En el anejo 2 se describe detalladamente la metodología empleada.

En la Tabla 68 se muestran los porcentajes de bacterias PAO y GAO respecto al total de microorganismos presentes obtenidos para los distintos TRC utilizados. Este porcentaje se refiere a la prueba EUBmix. La

proporción de bacterias PAO disminuye notoriamente entre la edad de fango de 6.5 días y la de 8 días. Entre los TRC de 8 y 9 días la concentración de los microorganismos acumuladores de fósforo presenta una disminución menor.

Si bien la edad de fango de 6.5 días no favorece el crecimiento de bacterias GAO, se observa en Tabla 68 que en esta edad existe una pequeña proporción de microorganismos acumuladores de glucógeno. Es posible notar que la concentración de bacterias GAO se incrementa a medida que lo hace la edad de fango del proceso. En la Tabla 68 se ha incorporado la relación (GAOmix+DEFmix)/PAOmix, los cuales muestran el aumento de la población GAO respecto a la población de bacterias PAO.

Tabla 67: Sondas utilizadas en este estudio.

	Sonda	Secuencia (5'-3')	Grupo
EUBmix	EUB 338-I	GCTGCTCCCGTAGGAGT	Mayoría de bacterias
	EUB 338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Planctomycetes
	EUB 338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Verrucomicrobiales
PAOmix	PAO 462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	Intimamente relacionado a Rhodocyclus (Candidatus Accumulibacter phosphatis)
	PAO 651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	Intimamente relacionado a Rhodocyclus (Candidatus Accumulibacter phosphatis)
	PAO 846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	Intimamente relacionado a Rhodocyclus (Candidatus Accumulibacter phosphatis)
GAOmix	GAO Q431	TCCCCGCCTAAAGGGCTT	Candidatus Competibacter phosphatis
	GAO Q989	TTCCCCGGATGTCAAGGC	Candidatus Competibacter phosphatis
DEFmix	TFO_DF218	GAAGCCTTTGCCCTCAG	Defluvicoccus relacionados a TFO ¹ in α -proteobacteria
	TFO_DF618	GCCTCACTTGTCTAACCG	Defluvicoccus relacionados a TFO ¹ in α -proteobacteria

¹: organismos formadores de tétradas.

En la Figura 70 se muestra a modo de ejemplo una hibridación con las sondas EUBmix, que da una coloración verde, y la sonda PAO mix de color naranja. Esta hibridación corresponde a la edad de fango de 9 días en la cual

es posible observar la presencia de bacterias acumuladoras de fósforo en el fango.

Tabla 68: Porcentajes de las pruebas PAOmix y GAOmix respecto a EUBmix.

	TRC		
	6.5 días	8 días	9 días
PAOmix/EUBmix	31%	17 %	14 %
GAOmix/EUBmix	2 %	4 %	5 %
DEFmix/EUBmix	<1%	<1%	<1%
(GAOmix+DEFmix)/PAOmix	0.06	0.24	0.36

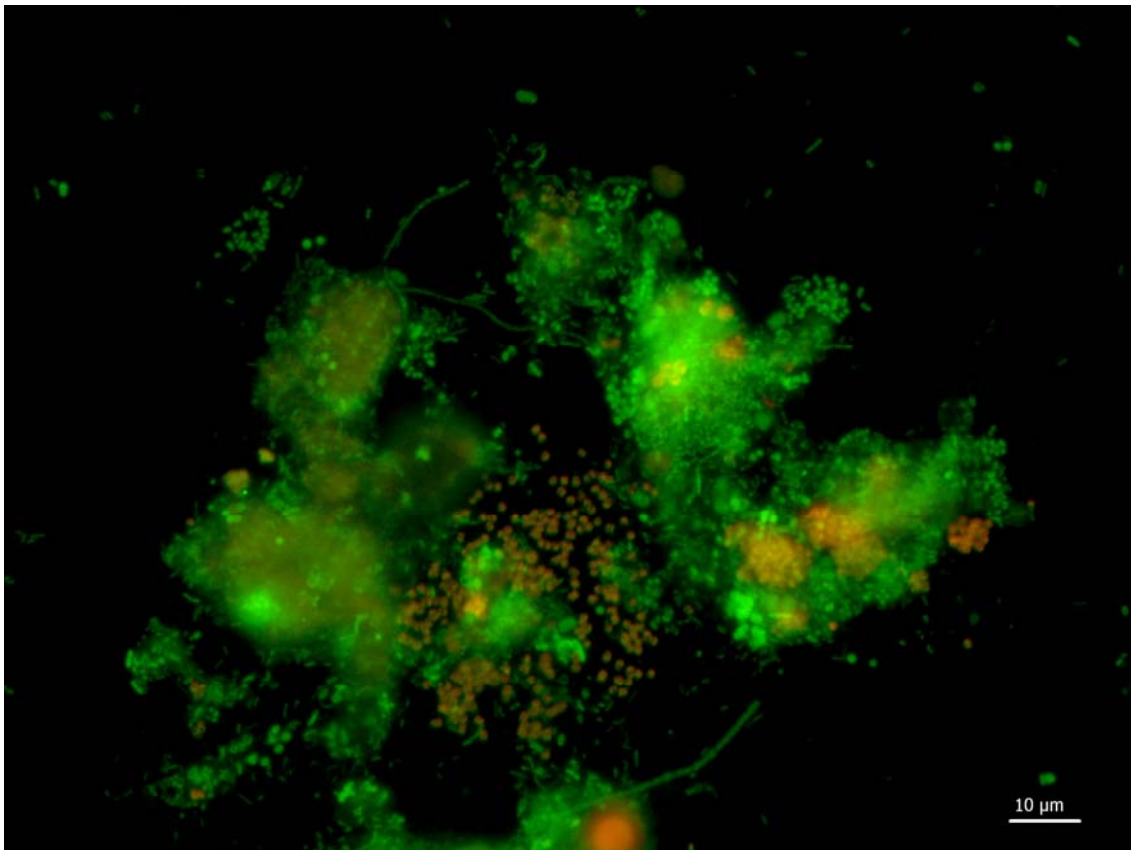


Figura 70: Sondas EUBmix (color verde) y PAOmix (naranja).

Los resultados del seguimiento microbiológico respaldan los valores de los parámetros de las bacterias PAO obtenidos en las diferentes edades de fango. Así también, los resultados del análisis del fango mediante la técnica FISH permiten explicar la variación observada en la composición de los polihidroxicanoatos entre los diferentes TRC analizados.

La disminución tan importante de bacterias PAO que se produce entre las edades de fango de 6.5 y 8 días muestra que el efecto del TRC sobre el desarrollo de la población de bacterias PAO es muy importante. Se considera que la disminución en la concentración de bacterias PAO, es la verdadera responsable de la marcada disminución observada en el valor del parámetro Y_{PO_4} entre las edades de fango de 6.5 y 8 días. Se observa, además, que entre las edades de 8 y 9 días se ha producido un aumento de bacterias GAO y una pequeña disminución de la concentración de bacterias PAO. Si bien esta variación en la composición de la población bacteriana no ha conducido a una disminución significativa del parámetro Y_{PO_4} sí se ha originado una disminución del parámetro K_{MAX} desde 0.33 a 0.30 mg P/mg DQO entre las edades de fango de 8 y 9 días. Esto indica que en el TRC más elevado la proporción PAO/GAO presente ha generado un deterioro del proceso de eliminación de fósforo.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con las observaciones realizadas por Whang y col., (2007). Estos autores observaron que las bacterias PAO optimizan la distribución del polihidroxicanoato en condiciones aerobias destinando una mayor proporción de X_{PHA} para crecimiento que las bacterias GAO. De esta forma cuando la edad de fango es baja, aunque las bacterias GAO consuman igual o mayor proporción de ácido acético, destinan una elevada cantidad del polímero X_{PHA} para regenerar el glucógeno y una baja cantidad para el crecimiento. En estas condiciones las bacterias acumuladoras de fósforo presentan una clara ventaja respecto a los microorganismos acumuladores de glucógeno. Esto puede explicar la elevada concentración de bacterias PAO obtenida en el TRC de 6.5 días y la escasa presencia de microorganismos GAO. Al

aumentar la edad de fango a 8 días se produce un cambio apreciable en la distribución de la población bacteriana, dado que disminuye notablemente la concentración de bacterias PAO y aumenta la de bacterias GAO. Esto indica que en esas condiciones los microorganismos acumuladores de glucógeno logran desarrollarse en mayor medida. Finalmente, en el TRC de 9 días disminuye aún más la concentración de microorganismos PAO, aumentando al mismo tiempo la presencia de bacterias GAO.

El trabajo experimental se ha realizado con dos esquemas diferentes de operación. Un primer esquema se ha empleado en el estudio desarrollado con las edades de fango de 6.5 y 8 días y un segundo esquema para desarrollar la fase experimental destinada a proponer un nuevo procedimiento de calibración del modelo. Al analizar los valores de los parámetros calibrados en ensayos *off-line* se ha detectado que algunos de estos parámetros han sufrido variaciones. El cambio observado en los mismos está originado principalmente en el aumento del TRC del proceso. Se considera que la modificación implementada en la planta piloto no ha provocado alteraciones en el sistema que se puedan traducir en variaciones de los parámetros calibrados en los ensayos *off-line*.

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo son:

- 1- El análisis realizado a los métodos de caracterización físico-químico y respirométrico de la materia orgánica presente en el agua residual ha permitido establecer una metodología adecuada de caracterización de las componentes biodegradables.
- 2- En el procedimiento de caracterización físico-químico es conveniente el empleo del tamaño de filtro de 0.1 μm para lograr un fraccionamiento adecuado del agua residual.
- 3- En la valoración de la fracción S_s por medio del análisis respirométrico es necesario emplear un cociente inicial F_0/X_0 que proporcione condiciones experimentales similares a las empleadas en la determinación del rendimiento Y_H . De esta manera se garantiza que la bacteria destine la misma proporción de DQO para crecimiento que la considerada en el parámetro Y_H .
- 4- El método de caracterización físico-químico y el análisis respirométrico brindan valores semejantes de la fracción S_s . Sin embargo, se han observado notables diferencias entre las componentes X_s obtenidas con ambos métodos. Esto se debe a que el análisis respirométrico permite evaluar sólo la fracción de materia orgánica fácilmente hidrolizable. Debido a la limitación que presenta el análisis respirométrico se considera que el método físico-químico es más adecuado para caracterizar el agua residual.
- 5- El procedimiento destinado a mejorar el método de calibración *off-line* del modelo BNRM1 ha proporcionado una metodología rigurosa de estimación de parámetros. El muestreo óptimo de cada experimento,

basado en el análisis de sensibilidad de los mismos, como así también las medidas del polímero polihidroxicanoato, X_{PHA} , consideradas en el ensayo de calibración de las bacterias PAO en condiciones aerobias permiten estimar de manera adecuada los diferentes conjuntos de parámetros.

- 6- El contenido de X_{PHA} se ha determinado mediante cromatografía gaseosa. Si bien la implementación de esta metodología presenta cierta dificultad, se ha podido establecer claramente la evolución de este compuesto en las condiciones aerobias.
- 7- El rendimiento X_{PHA}/S_A no cumple la relación propuesta por el modelo BNRM1. En este trabajo se obtuvo un rendimiento aproximado de 1.4 mol C/mol C en las tres edades de fango, el cual se asemeja a los valores publicados en la bibliografía. Los rendimientos obtenidos en este trabajo respaldan a los modelos que asumen que una parte del poder reductor, necesario para la formación de X_{PHA} , se obtiene de la hidrólisis del glucógeno almacenado intracelularmente.
- 8- En condiciones aerobias el polímero X_{PHA} describe un comportamiento diferente al propuesto por el modelo BNRM1. En estas condiciones las bacterias PAO conservan una pequeña proporción del polímero que podría estar destinada a los procesos de mantenimiento celular.
- 9- El análisis de sensibilidad del ensayo de calibración *off-line* de las bacterias PAO en condiciones aerobias ha puesto de manifiesto la necesidad de incorporar los datos de X_{PHA} en el procedimiento de calibración. Si se tiene en cuenta únicamente el registro de la OUR y del X_{PP} es posible identificar los parámetros Y_{PAO} , $K_{MAX}X_{PAO}$, $\mu_{PAO}X_{PAO}$ y $q_{PP}X_{PAO}$ a partir de los datos experimentales de estas variables. Sin embargo, al considerar también la evolución del polímero X_{PHA} se puede mejorar la identificabilidad de los parámetros $K_{PHA}X_{PAO}$ y

$K_{MAX}X_{PAO}$. De esta manera es posible lograr una mejor estimación del conjunto de parámetros empleando esta metodología.

- 10- El análisis de sensibilidad de los diferentes ensayos de calibración *off-line* ha permitido mejorar la metodología empleada incorporando un muestreo exhaustivo en el intervalo del ensayo donde los parámetros exhiben una elevada sensibilidad.
- 11- La metodología de calibración del modelo BNRM1 propuesta en este trabajo, que considera no sólo la información experimental recogida en ensayos específicos sino también datos dinámicos del proceso, permite simular en forma adecuada el comportamiento estable y dinámico del tratamiento biológico.
- 12- El análisis de sensibilidad en estado estacionario ha mostrado que un grupo importante de parámetros calibrados en experimentos *off-line* exhiben una elevada medida de la sensibilidad. Principalmente entre los que presentan mayor influencia en la respuesta del modelo se encuentran los parámetros de las bacterias PAO y autótrofas. Su elevada sensibilidad justifica el procedimiento de identificación que se realiza mediante ensayos *off-line* en los cuales las condiciones experimentales se controlan en forma adecuada.
- 13- Entre los parámetros del modelo que exhiben una notable sensibilidad se encuentran los que caracterizan el proceso de las bacterias acidogénicas: μ_{ACID} y b_{ACID} . Este resultado respalda la modificación introducida por el modelo BNRM1 al considerar la actividad de esta población bacteriana en el proceso de eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes.
- 14- El análisis de sensibilidad en estado estacionario se ha empleado también para determinar las variables más sensibles a las

perturbaciones de los parámetros. Se ha observado que las concentraciones de S_{PO_4} , S_{NH_4} y DQO_{SOL} del efluente contienen suficiente información experimental para el procedimiento de calibración dinámica.

- 15- Los parámetros μ_{ACID} y $K_{NH_4 HET}$ seleccionados de acuerdo al análisis de sensibilidad del sistema en estado estacionario, se identificaron a partir de los datos dinámicos de las variables S_{PO_4} y DQO_{SOL} . El valor de $\mu_{ACID} = 0.97 \text{ d}^{-1}$ obtenido con este procedimiento es similar a los valores publicados en la bibliografía (Bouzas, 2003; Ribes, 2005). Si bien estas bacterias presentan una velocidad baja de crecimiento su actividad puede influir notablemente en el proceso de eliminación de fósforo.
- 16- En este trabajo de investigación se ha comprobado la importancia del análisis de sensibilidad del sistema en estado estacionario. El modelo logró una adecuada descripción de los datos experimentales de S_{PO_4} y DQO_{SOL} del efluente modificando los parámetros seleccionados con el estudio de sensibilidad.
- 17- El procedimiento de calibración del modelo BNRM1 propuesto en este trabajo se basa principalmente en una metodología de calibración *off-line* de los parámetros más sensibles del modelo. Al incorporar datos dinámicos se ha logrado la identificación de parámetros que exhiben una elevada sensibilidad y que no se han determinado en los ensayos específicos.
- 18- La curva de variación diaria del influente y efluente demuestran que el proceso está sometido a notables cambios en la calidad del agua residual que entra a la planta. La concentración de amonio del influente como así también las componentes de materia orgánica presentan una variabilidad muy pronunciada.

- 19- Algunos de los parámetros de las bacterias PAO, calibrados a partir de ensayos específicos *off-line*, exhiben cierta variación con la edad de fango. Se considera que este cambio es una consecuencia del aumento de la concentración de bacterias GAO cuando se incrementa el TRC del proceso. Así también, la composición de los polihidroxicanoatos, entre las diferentes edades de fango, indica que la presencia de bacterias GAO es más importante cuando se incrementa la edad de fango. El seguimiento microbiológico, realizado con la técnica de hibridación FISH, ha proporcionado datos que respaldan estas observaciones. Al aumentar la edad del fango no sólo se incrementa la población de bacterias GAO sino que decae notoriamente la concentración de bacterias PAO. Esta disminución es muy marcada entre las edades de fango de 6.5 y 8 días.
- 20- Los valores de los parámetros obtenidos con la metodología de calibración *off-line* en las tres edades de fango presentan algunas diferencias. Se estima que estas diferencias están vinculadas fundamentalmente con el aumento de la edad de fango del proceso. Se considera que la modificación de la planta piloto no ha introducido alteraciones en el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

6 BIBLIOGRAFÍA

Amman R, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Deveroux R, Stahl DA. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow-cytometry for analyzing mixed microbial-populations. *Appl Environ Microbiol.* 56, 1919-1925.

Barat R., Montoya T., Borrás L., Ferrer J., Seco A. (2008) Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism. *Wat Res.* 42, 3415-3424.

Blanco Gonzalez C. (2005). Estudio del proceso de acidogénesis de fangos activados. Modelación y metodología de calibración de parámetros. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia.

Boursier H., Beline F., Paul E. (2005). Piggery wastewater characterisation for biological nitrogen removal process design. *Bioresource Technol.* 96, 351–358.

Bouzas A. (2003) Optimización de la fermentación de fango primario para la producción de ácidos grasos volátiles necesarios para la eliminación biológica en EDAR. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medioambiente. Universidad Politécnica de Valencia.

Boyer R. F. (2000) Conceptos en bioquímica. International Thomson. México.

Brandl H., Gross R.A., Lenz R.W., Fuller R.C. (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol.* 54, 1977–1982.

Braunegg G., Sonnleitner B., Lafferty R. M. (1978) A rapid gas chromatographic method for determination of poly-B-hydroxy butiric acid in microbial biomass. *Bio Technol.* 6, 29-37.

Brdjanovic D., van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Mino T., Alaerts G.J., Heijnen J.J., Keller J. (ed.) (1999) Innovative methods for sludge characterization in biological phosphorus removal systems. *Wat Sci Tech.* 39, 37-43.

Brouwer H., Klapwijk A., Keesman K.J. (1998) Identification of activated sludge and wastewater characteristics using respirometric batch-experiments. *Wat Res.* 32, (4) 1240-1254.

Brun R., Kuhni M., Siegrist H., Gujer W., Reichert P. (2002) Practical identifiability of ASM2d parameters – systematic selection and tuning of parameter subsets. *Wat Res.* 36, (16) 4113–4127.

Carvalho G. B., Lemos P. C., Oehmen A., Reisa M. (2007). Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure. *Wat Res.* 41, 4383-4396.

Chen Y., Randall A.A., McCue T. (2004) The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid. *Wat Res.* 38, 27–36.

Çokgör E. U., Sözen S., Orhon D., Henze M. (1998). Respirometric analysis of activated sludge behaviour-I Assessment of the readily biodegradable substrate. *Wat Res.* 32, (2) 461-475.

Comeau Y., Hall K. J., Oldham W. K. (1988) Determination of Poly-B-hydroxy butyrate and Poly-B-hydroxy valerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. *Appl Environ Microbiol.* 54, (9) 2325-2327.

Comeau Y., Hall K.J., Hancock R.E.W., Oldham W.K., (1986) Biochemical-model for enhanced biological phosphorus removal. *Wat Res.* 20, (12) 1511–1521.

Crocetti G.R., Banfield J.F., Keller J., Bond P.L., Blackall, L.L. (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiol.* 148, 3353–3364.

Crocetti G.R., Hugenholtz P., Bond P.L., Schuler A., Keller J., Jenkins D., Blackall L.L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl Environ Microbiol.* 66, 1175-1182.

Cutrera G., Manfredi L., del Valle C.E., Froilan J. (1999) On the determination for the DBO test. *Water SA.* 25, (3) 377-379.

Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol.* 22, 434-444.

De Robertis E.D.P., De Robertis E.M.F. (1998). *Biología Celular y molecular.* El Ateneo, Bs. As.

Ekama G.A., Dold P.L., Marais G.vR. (1986) Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge. *Wat Sci Technol.* 18, 91-114.

Ferrer J., Seco A., Serralta J., Ribes J., Manga J., Asensi E., Morenilla J. J., Llavador F. (2008) DESASS: A software tool for designing, simulating and optimising WWTPs. *Environ Modelling & Software.* 23, 19-26.

Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady C.P.L. (2001a). A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH. *Biotechnol Bioeng.* 76, (1) 17–31.

Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady C.P.L. (2001b). Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture

of phosphorus-accumulating organisms at different pHs. *Biotechnol Bioeng.* 76, (1) 32–43.

García-Usach, M.F. (2002) Efecto del tiempo de retención celular y la temperatura en los procesos de eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes de las aguas residuales. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia.

Grady C.P.L., Jr. Daigger G.T., Lim H.C. (1999) *Biological wastewater treatment*. Second edition, revised and expanded. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel.

Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Wentzel M.C., Marais G.V.R., van Loosdrecht M.C.M. (1999) Activated Sludge Model N° 2d. *Wat Sci Technol.* 39, (1) 165-182.

Henze M., Grady C.P.L., Gujer W., Marais G.v.R., Matsuo T. (1987) *Activated Sludge Model No.1. IAWPRC Scientific and Technical Report No.1.* IAWPRC, London. ISSN 1010-707X.

Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Wentzel M.C., Marais G.v.R. (1995) *Activated Sludge Model No.2. IAWQ Scientific and Technical Report No.2.* IAWQ, London.

Hesselmann R.P.X., Von Rummell R., Resnick S.M., Hany R., Zehnder, A.J.B. (2000) Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal. *Wat Res.* 34, (14) 3487–3494.

Hesselmann R.P.X., Werlen C., Hahn, D. van der Meer J.R., Zehnder, A.J.B. (1999) Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst Appl Microbiol.* 22, (3) 454–465.

Hu Z., Chandran K., Smets B. F., Grasso D. (2002) Evaluation of a rapid physical–chemical method for the determination of extant soluble COD. *Wat Res.* 36, 617–624

Hulsbeek J.J.W., Kruit J., Roeleveld P.J., van Loosdrecht M.C.M. (2002) A practical protocol for dynamic modelling of activated sludge systems. *Wat Sci Technol.* 45, (6) 127–136.

Insel G., Sin G., Lee D., Nopens I., Vanrolleghem P. A. (2006) A calibration methodology and model-based systems analysis for SBRs removing nutrients under limited aeration conditions. *J Chem Technol Biotechnol.* 81, 679-687.

Kuba T., Murnleitner E., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen, J.J. (1996) A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnol Bioeng.* 52, (6) 685–695.

Langergraber G., Rieger L., Winkler S., Alex J., Wiese J., Owerdieck C., Ahnert M., Simon J., Maurer M. (2004) A guideline for simulation studies of wastewater treatment plants. *Wat Sci Technol.* 50, (7) 131–138.

Lemos P.C., Serafim L.S., Reis M.A.M. (2006) Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *J Biotechnol.* 122, 226-238.

Levine A. D., Tchobanoglous G., Asano T. (1991) Size distributions of particulate contaminants wastewater and their impact on treatability. *Wat Res.* 25, 911–22.

Liu W., Mino T., Nakamura K., Matsuo T. (1996) Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal. *Wat Res.* 1, 75-82.

Liu W., Nakamura K., Matsuo T., Mino T. (1997) Internal energy-based competition between polyphosphate and glycogen accumulating bacteria in

biological phosphorus removal reactors-Effect of P/C feeding ratio. *Wat Res.* 31, (6) 1430-1438.

Makinia J., Rosenwinkel K., Spering V. (2005) Long-term simulation of the activated sludge process at the Hanover-Gümmerwald pilot WWTP. *Wat Res.* 39, 1489-1502.

Makinia J., Rosenwinkel K., Spering V. (2006) Comparison of two model concepts for simulation of nitrogen removal at a full-scale biological nutrient removal pilot plant. *J Environ Eng.* 476-487.

Manga J., Ferrer J., García-Usach F., Seco A. (2001) A modification to the Activated Sludge Model N° 2 based on the competition between phosphorus-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Wat Sci Technol.* 43, (11) 161-171.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.H. (1992) Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria - Problems and Solutions. *Syst Appl Microbiol.* 15, 593-600.

Marsili Libelli S., Ratini P., Spagni A., Bortone G. (2001) Implementation, study and calibration of a modified ASM2d for the simulation of SBR processes. *Wat Sci Technol.* 43, (3) 69-76.

Mathieu S., Etienne P. (2000) Estimation of wastewater, biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various So/Xo ratios. *Wat Res.* 34, (4) 1233-1246.

Melcer H., Dold P.L., Jones R.M., Bye C.M., Takacs I., Stensel H.D., Wilson A.W., Sun P., Bury S. (2003) Methods for wastewater characterisation in activated sludge modeling. Water Environment Research Foundation (WERF), Alexandria, VA, USA.

Metcalf & Eddy (1995) Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Mc Graw Hill.

Mino T., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen, J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Wat Res.* 32, (11) 3193–3207.

Nelson D. L., Cox M. M. (2006) *Lehninger Principios de bioquímica*. Ediciones Omega. 4^{ta} edición.

Nowak O., Franz A., Svardal K., Muller V., Kuhn V. (1999) Parameter estimation for activated sludge models with the help of mass balances. *Wat Sci Technol.* 39, (4) 113–120.

Nuhoglu A., Keskinler B., Yildiz E. (2004) Mathematical modelling of the activated sludge process—the Erzincan case. *Process Biochem.* 40, (7) 2467-2473.

Oehmen A., Keller-Lehmann B., Zeng R.J., Yuan Z., Keller J. (2005b) Optimisation of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. *J Chromatography.* 1070, 131-136.

Oehmen A., Yuan Z., Blackall L.L., Keller J. (2005a) Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnol Bioeng.* 91, (2) 162-168.

Orhon D., Cokgör E.U. (1997) COD Fractionation in Wastewater Characterization. The State of the Art. *J Chem Tech Biotechnol.* 68, 283-293.

Orhon D., Okutman D. (2003) Respirometric assessment of residual organic matter for domestic sewage. *Enzyme and Microbial Technol.* 32, (5) 560-566.

Orhon D., Okutman D., Insel G. (2002) Characterisation and biodegradation of settleable organic matter for domestic wastewater. *Water SA.* 28, (3) 299-306.

Penya-Roja J.M., Seco A., Ferrer J., Serralta J. (2002). Calibration and validation of Activated Sludge Model No. 2d for Spanish municipal wastewater. *Environ Technol.* 23, 849-862.

Pereira H., Lemos P. C., Reis M., Crespo J., Carrondo M., Santos H. (1996) Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes base on in vivo C-NMR labelling experiments. *Wat Res.* 30, (9) 2128-2138.

Pijuan M., Saunders A. M., Guisasola A., Baeza J. A., Casas C., Blackall L. L. (2004) Enhanced Biological Phosphorus Removal in a Sequencing Batch Reactor Using Propionate as the Sole Carbon Source. *Biotechnol Bioeng.* 85, 56-67.

Ribes J. (2005) Modelació de sedimentadors en plantes de tractament d'aigües residuals. Aplicació al procés de fermentació-elutriació de fangs primaris. Departamento de Ingeniería Química. Universitat de València.

Rieger L., Koch G., Kuhni M., Mujer W., Siegrist H. (2001) The eawag Bio-P module for activated sludge model N° 3. *Wat Res.* 35, (16) 3887-3903.

Roeleveld P.J., Van Loosdrecht M.C.M. (2002) Experiences with guidelines for wastewater characterization in The Netherlands. *Wat Sci Tech.* 45, (6) 77-87.

Sato H., Mino T., Matsuo T. (1994) Deterioration of enhanced biological phosphorus removal by the domination of microorganisms without polyphosphate accumulation. *Wat Sci Tech.* 30, (6) 203-211.

Saunders A.M., Mabbett A.N., McEwan A.G., Blackall L.L. (2007) Proton motive force generation from stored polymers for the uptake of acetate under anaerobic conditions. *Microbiol Lett.* 274, 245-251.

Saunders A.M., Oehmen A., Blackall L.L., Yuan Z., Keller, J. (2003) The effect of GAOs (glycogen accumulating organisms) on anaerobic carbon

requirements in full-scale Australian EBPR (enhanced biological phosphorus removal) plants. *Wat Sci Technol.* 47, (11) 37–43.

Seco A., Ribes J., Serralta J., Ferrer J. (2004) Biological Nutrient Renoval Model N° 1 (BNRM1). *Wat Sci Technol.* 50, (6) 69-78.

Serralta J., Ferrer J., Borrás L., Seco A. (2004) An extension of ASM2d including pH calculation. *Wat Res.* 38, (19) 4029-4038.

Siegrist H., Tschui M. (1992) Interpretation of experimental data with regard to the activated sludge model no. 1 and calibration of the model for municipal wastewater treatment plants. *Wat Sci Technol.* 25, (6) 167-183.

Sin G. (2004) Ph.D. Thesis. Systematic Calibration of Activated Sludge Models. Universiteit Gent. Belgium.

Smolders G.J.F. (1995) A structured metabolic model for the anaerobic and aerobic stoichiometry of the biological phosphorus removal process. *Biotechnol Bioeng.* 47, 277-287.

Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotechnol Bioeng.* 43, 461-470.

Sözen S., Çokgör E. U., Orhon D., Henze M. (1998) Respirometric analysis of activated sludge behaviour-II Heterotrophic growth under aerobic and anoxic conditions. *Wat Res.* 32, (2) 476-488.

Sperandio M., Paul E. (2000) Estimation of wastewater, biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various S_0/X_0 ratios. *Wat Res.* 34, (4) 1233-1246.

Standard methods for the examination of water and wastewater (APHA, 2005).

Vanrolleghem P.A., Dochain D. (1998) Bioprocess Model Identification. In: Advanced Instrumentation, Data Interpretation, and Control of Biotechnological Processes. Edited by Van Impe J., Vanrolleghem P.A. and Iserentant D. Kluwer Academic Publishers. 251-318.

Vanrolleghem P.A., Insel G., Petersen B., Sin G., De Pauw D., Nopens I., Dovermann H., Weijers S., Gernaey K. (2003) A comprehensive model calibration procedure for activated sludge models. WEFTEC2003.

Vollertsen J., Hvitved-Jacobsen T. (2002) Biodegradability of wastewater – a method for COD-fractionation. *Wat Sci Technol.* 45, (3) 25-34.

Wentzel M. C., Mbewe A. Lakay M. T., Ekama G. A., (1999) Batch test for characterisation of the carbonaceous materials in municipal wastewaters *Water SA.* 25, (3) 327-335.

Wentzel M.C., Lötter L.H., Ekama G.A., Loewenthal R.E., Marais, G.v.R. (1991) Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal. *Wat Sci Tech.* 23, 567-576.

Wentzel M.C., Lötter L.H., Loewenthal R.E. y Marais, G.v.R. (1986) Metabolic behavior of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphate removal - a biochemical model. *Water SA.* 12, (4) 209-224.

Whang L.M., Filipe C.D.M., Park J.K. (2007) Model-based evaluation of competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms. *Wat Res.* 41, 1312-1324.

Whang L.M., Park J.K. (2006) Competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms- effect of temperature and sludge age. *Wat Environ Res.* 78, 4-11.

Wong M.T., Tan F.M., Ng W.J., Liu W.T. (2004) Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Microbiology-Sgm.* 150, 3741-3748.

Yagci N., Artan N., Çokgör E.U. Randall C.W., Orhon D. (2003) Metabolic model for acetate uptake by a mixed culture of phosphate- and glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng.* 84, (3) 359-373.

Zeng R.J., van Loosdrecht M.C.M., Yuan Z.G., Keller J. (2003) Metabolic model for glycogen-accumulating organisms in anaerobic/aerobic activated sludge systems. *Biotechnol Bioeng.* 81, (1) 92–105.

ANEJOS

ANEJO I

En este anejo se recogen los datos obtenidos en la caracterización dinámica.

Tabla 69: Datos del influente de la caracterización dinámica.

INFLUENTE						
Tiempo (h)	DQO _{TOT} (mg DQO/l)	DQO _{SOL} (mg DQO/l)	DBO _{TOT L} (mg DQO/l)	DBO _{SOL L} (mg DQO/l)	S _{A INF} (mg DQO/l)	S _{A INF} +S _{A ALIM} ⁽¹⁾ (mg DQO/l)
16:00	317	219	217	164	49	125
17:00	362	240	217	188	46	122
18:00	353	225	217	184	56	132
19:00	389	243	259	196	62	138
20:00	389	249	270	197	66	142
21:00	374	228	262	178	50	126
22:00	371	219	240	172	58	134
23:00	365	215	225	175	53	129
0:00	344	179	239	138	45	121
1:00	327	148	240	109	35	111
2:00	340	160	242	126	39	115
3:00	340	163	242	120	39	115
4:00	340	166	239	125	32	108
5:00	327	151	242	113	31	107
6:00	315	141	236	94	35	111
7:00	315	128	231	83	23	99
8:00	253	115	186	76	27	103
9:00	266	118	185	76	31	107
10:00	260	115	187	77	25	101
11:00	266	112	186	74	7	83
12:00	303	104	189	68	18	94
13:00	281	116	155	84	7	83
14:00	295	123	155	82	12	88
15:00	305	126	160	91	15	91

(1): S_{A ALIM} = 76 mg DQO/l

Tabla 70: Datos del influente de la caracterización dinámica.

INFLUENTE						
Tiempo (h)	SST (mg SS/l)	SSV (mg SS/l)	S _{NH4} (mg N/l)	S _{NO3} (mg N/l)	S _{PO4 INF} (mg P/l)	S _{PO4 INF} + S _{PO4 ALIM} ⁽¹⁾ (mg P/l)
16:00	108	92	45.2	1.5	4.4	7.7
17:00	130	114	44.3	0.7	5.2	8.5
18:00	130	118	42.7	0.7	4.9	8.2
19:00	124	94	44.5	1.6	4.7	8.0
20:00	122	92	44.1	2.2	4.5	7.8
21:00	114	92	44.3	0.8	4.4	7.7
22:00	110	96	43.7	0.2	4.7	8.0
23:00	118	84	42.9	0.8	4.3	7.6
0:00	98	94	42.7	1.3	4.5	7.8
1:00	102	95	39.9	0.5	4.7	8.0
2:00	106	96	40.2	2.7	4.9	8.2
3:00	122	106	40.8	1.7	4.6	7.9
4:00	128	98	39.0	1.4	5.1	8.4
5:00	120	96	39.5	0.3	5.0	8.3
6:00	124	90	39.5	1.1	5.0	8.3
7:00	111	80	40.0	1.9	5.0	8.3
8:00	98	70	45.0	1.1	4.2	7.5
9:00	101	70	45.9	0.7	4.7	8.0
10:00	104	70	47.1	1.7	4.9	8.2
11:00	106	70	50.1	0.7	5.2	8.5
12:00	107	73	48.7	0.7	4.6	7.9
13:00	108	76	45.8	0.4	4.2	7.5
14:00	96	80	47.5	0.5	4.0	7.3
15:00	96	84	45.3	0.9	4.0	7.3
(1): S _{PO4 ALIM} = 3.3 mg P/l						

Tabla 71: Datos del efluente de la caracterización dinámica.

EFLUENTE						
Tiempo (h)	DQO _{TOT} (mg DQO/l)	DQO _{SOL} (mg DQO/l)	S _{PO4} (mg P/l)	S _{NH4} (mg N/l)	S _{NO3} (mg N/l)	N _{TOT SOL} (mg N/l)
0:00	68	33	1.6	0.4	9.7	12.2
1:00	48	34	1.8	0.4	9.5	11.5
2:00	50	33	1.7	0.3	9.6	11.0
3:00	55	32	1.6	0.2	8.8	10.9
4:00	55	33	1.5	0.2	8.4	10.7
5:00	59	32	1.5	0.2	8.6	10.4
6:00	58	34	1.4	0.1	7.9	9.7
7:00	70	33	1.1	0.1	8.1	9.8
8:00	63	32	0.9	0.2	8.2	9.9
9:00	50	33	0.8	0.2	8.4	10.2
10:00	48	32	0.6	0.2	8.5	9.9
11:00	47	34	0.4	0.1	8.3	9.8
12:00	41	35	0.3	0.1	8.1	9.8
13:00	41	34	0.4	0.1	7.8	9.8
14:00	35	35	0.5	0.2	7.2	9.2
15:00	37	33	0.6	0.1	7.3	9.3
16:00	40	35	0.6	0.1	7.4	9.1
17:00	42	36	0.6	0.1	7.7	9.3
18:00	48	36	0.6	0.1	8.0	9.5
19:00	48	35	0.8	0.2	9.1	10.7
20:00	49	34	0.8	0.2	9.3	11.2
21:00	50	33	0.9	0.3	9.4	11.3
22:00	45	33	1.1	0.3	9.7	11.5
23:00	54	33	1.4	0.4	9.7	11.7
DBO _{SOL EFL} = 2 mg DQO/l.						

Tabla 72: Componentes del agua residual de la caracterización dinámica.

Tiempo (h)	S _I (mg DQO/l)	S _S (mg DQO/l)	S _F (mg DQO/l)	X _S (mg DQO/l)	X _I (mg DQO/l)
16:00	31	188	139	29	69
17:00	32	208	162	9	113
18:00	31	194	138	23	105
19:00	30	213	151	46	100
20:00	31	218	152	52	88
21:00	30	198	148	64	82
22:00	32	187	129	53	99
23:00	31	184	131	41	109
0:00	30	149	104	90	75
1:00	31	118	83	123	57
2:00	30	130	90	112	68
3:00	32	131	92	111	66
4:00	33	133	102	106	68
5:00	32	119	87	123	53
6:00	33	108	74	128	46
7:00	31	97	73	134	53
8:00	33	82	56	104	34
9:00	34	84	52	101	47
10:00	34	81	56	106	39
11:00	33	79	72	107	47
12:00	32	72	54	117	82
13:00	31	85	78	70	95
14:00	31	92	80	63	109
15:00	31	95	80	65	114

ANEJO II

En este anejo se describe el procedimiento de hibridación in-situ, FISH.

Reactivos

- 1- Paraformaldehído (Fijación)
 - 1- Calentar 65 ml de agua bidestilada hasta 60°C
 - 2- Añadir 4 g de paraformaldehído (PFA)
 - 3- Añadir 1 gota de solución de NaOH 2M y agitar rápidamente hasta que la solución se haya clarificado
 - 4- Quitar de la fuente de calor y añadir 33 ml de PBS 3X
 - 5- Ajustar el pH a 7.2 con HCl
 - 6- Eliminar cualquier resto de cristales por filtración a través de 0.2 µm
 - 7- Enfriar rápidamente a 4°C y conservar a esa temperatura
- 2- Tampón fosfato salino (XPBS) (Fijación)
 - 1- Esterilizar por filtración 0.45 µm ó 0.2 µm
 - 2- Conservar a 4°C. Se utiliza frío

Preparar 3X PBS para reactivo de paraformaldehído: 22.8 g de NaCl, 3 g de NaH₂PO₄ 2.88 g de Na₂HPO₄ 1000 ml Agua destilada ajustar a pH 7.4. Primero disolver los fosfatos, y luego el cloruro sódico.

 - 1- Esterilizar por filtración 0.45 µm ó 0.2 µm
 - 2- Conservar a 4°C. Se utiliza frío
- 3- Solución de gelatina (preparación portaobjetos)

Gelatina al 0.1 %, Sulfato potásico cromato al 0.01 % (Sigma ref. C-5926, 12H₂O)

 - 1- Calentar agua destilada a 60°C
 - 2- Fundir la gelatina (100 mg de gelatina + 10 mg de sal de cromato ·12H₂O) en 100 ml de agua destilada
 - 3- Enfriar a 50°C para sumergir los portas
- 4- Solución de limpieza de portaobjetos FISH

Reactivo de limpieza: Etanol con 10 % KOH

5- Etanol 100% (Fijación y lavado)

Reactivo etanol absoluto grado PRS. Guardar a temperatura ambiente para lavados, y a 4°C para fijación.

6- Etanol 80% (Lavado)

160 ml de etanol absoluto, 40 ml de agua destilada.

Guardar a temperatura ambiente

7- Etanol 50% (Lavado)

100 ml de etanol absoluto, 100 ml de agua destilada

Guardar a temperatura ambiente

8- Cloruro Sódico 5M (Tampón de hibridación y tampón de lavado)

292.2 g de cloruro sódico, 1000 ml de agua destilada

Disolver el NaCl en 800 ml de agua destilada y ajustar el volumen hasta un litro. Distribuir en alícuotas

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración.

9- EDTA 0.5M (cuando la concentración de formamida es \geq al 20%)

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración.

10- Tris-HCl 1M pH 8.0 (Tampón de hibridación y tampón de lavado)

121.1 g de tris base, 42 ml de HCl concentrado

Llevar a 1 litro con agua destilada

Preparación: pesar el tris y añadir a 800 ml de agua destilada. Añadir el HCl concentrado, completar con agua destilada hasta 1 litro. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración

11- Agua Mili-Q (Tampón de hibridación y tampón de lavado)

200 ml de agua Mili-Q

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración

- 12- SDS 10% (Tampón de hibridación y tampón de lavado)
 10 g de SDS
 Llevar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración
- 13- Formamida (Tampón de hibridación y tampón de lavado)
 Volúmenes de formamida y porcentaje en función de la sonda
 Guardar a temperatura ambiente
- 14- Tampón de hibridación
 Prepara en un tubo de microcentrífuga de 2 ml:

Tabla 73: Volúmenes de reactivos en función del porcentaje de formamida para la preparación del tampón de hibridación en la técnica FISH.

Reactivo	% de Formamida						
	10	20	25	30	35	40	45
NaCl 5M (µl)	360	360	360	360	360	360	360
HCl-Tris 1M (µl)	40	40	40	40	40	40	40
Formamida (µl)	200	400	500	600	700	800	900
Agua Mili-Q (µl)	1398	1198	1098	998	898	798	698
SDS 10% (µl)	2	2	2	2	2	2	2
Volumen Final (µl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000

Almacenar a 4°C

- 15- Tampón de lavado
 Precalear a 46 °C en un tubo de 50 ml:

Tabla 74: Volúmenes de reactivos en función del porcentaje de formamida para la preparación del tampón de lavado en la técnica FISH.

Reactivo	% de Formamida						
	10	20	25	30	35	40	45
NaCl 5M (µl)	4500	2150	1490	1020	700	460	300
EDTA 0.5M (µl)	500	500	500	500	500	500	500
HCl-Tris 1M (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Agua Mili-Q (ml)	44.45	46.3	46.96	47.43	47.75	47.99	48.15
SDS 10% (µl)	50	50	50	50	50	50	50
Volumen Final (ml)	50	50	50	50	50	50	50

Guardar a 4°C

16- Sondas marcadas

Concentración de sonda madre e hija

Rango de concentración de trabajo entre 25 y 50 ng

17- Citifluor

Reactivo para evitar pérdida de fluorescencia

Procedimiento

1- Tratamiento de los portaobjetos FISH cubiertos con Teflón

1- Lavar con solución de limpieza

2- Enjuagar con agua destilada

3- Secar al aire (proteger del polvo ambiental)

4- Cubrir con gelatina por inmersión en la solución de gelatina 0.1% con sulfato potásico cromato 0.01% (preparada en el momento, T = 60°C)

5- Secar al aire

2- Fijación de las muestras

GRAM negativas con paraformaldehído (PFA)

1- Lavar 1 ml de flóculo con 500 µl de PBS 1X (6000 rpm durante 3 minutos)

2- Añadir 3 volúmenes de PFA (750 µl) a 1 volumen (250 µl) de muestra y mantener a 4°C durante 1-3 h (mínimo 1 h – máximo 18 h)

3- Pellet las células por centrifugación (6000 rpm durante 3 minutos) y eliminar el fijador

4- Lavar las células con PBS 1X (500 µl)

- 5- Resuspender en PBS 1X (500 μ l) (para tener una concentración de $10^8 - 10^9$ células/ml) y añadir 1 volumen (500 μ l) de etanol absoluto frío (4°C)
- 6- Guardar a -20°C (se pueden conservar en condiciones varios meses las muestras)

GRAM positivas con etanol

- 1- Añadir 1 volumen de etanol absoluto (500 μ l) a 1 volumen (500 μ l) de muestra y mantener a 4°C durante 4 – 16 h
- 2- Pellet las células por centrifugación (6000 rpm durante 3 minutos) y eliminar el fijador
- 3- Lavar las células con PBS 1X (500 μ l)
- 4- Resuspender en PBS 1X (500 μ l) (para tener una concentración de $10^8 - 10^9$ células/ml) y añadir 1 volumen (500 μ l) de etanol absoluto frío (4°C) y mezclar
- 5- Guardar a -20°C (se pueden conservar en condiciones varios meses las muestras)

3- Aplicación de las muestras a los portaobjetos FISH

- 1- Poner un volumen de 3 μ l de muestra fijada en el portaobjetos
- 2- Secar al aire
- 3- Deshidratar en EtOH al 50% durante 3 minutos (por inmersión)
- 4- Deshidratar en EtOH al 80% durante 3 minutos (por inmersión)
- 5- Deshidratar en EtOH absoluto durante 3 minutos (por inmersión)
- 6- Tras la deshidratación, los portas pueden ser conservados indefinidamente

4- Hibridación “in situ”

- 1- Preparar la solución de hibridación con formamida (Tabla 73) en un eppendorf de 2 ml
- 2- De la solución de hibridación con formamida, reservar en un eppendorf 6 x (10-n) μ l, siendo n el volumen de sonda utilizada en

cada pocillo. Es decir:

Nº de pocillos en un porta: 6

Volumen total por pocillo (μ l): 10

Si $n = 1 \mu$ l guardaremos 54 μ l

Si $n = 2 \mu$ l guardaremos 48 μ l

Si $n = 3 \mu$ l guardaremos 42 μ l

- 3- Añadir al eppendorf reservado 6 μ l de sonda (6 pocillos por porta \rightarrow 6 μ l de sonda)
- 4- Poner un trozo de papel de celulosa dentro de un tubo Sarstedt de 50 ml y echar sobre el papel la solución de hibridación sin sonda
- 5- Poner 9 μ l de la solución de hibridación + 1 μ l de sonda en cada pocillo y repartir homogéneamente por todo el campo
- 6- Introducir el porta dentro del tubo Sarstedt, manteniendo siempre la posición horizontal
- 7- Incubar a 46 °C durante hora y media
- 8- Preparar 50 ml de la solución de lavado (Tabla 74), y atemperar a 48 °C
- 9- Sacar del horno y rápidamente lavar los portas e introducirlos dentro del tubo con la solución de lavado
- 10- Incubar en un baño a 48 °C durante 15 – 20 minutos
- 11- Lavar con agua destilada
- 12- Secar al aire en la oscuridad
- 13- Si no se observa al microscopio inmediatamente, guardar el porta a -20 °C dentro de un tubo Sarstedt de 50 ml