



Universidad
de Cádiz

**CARACTERIZACIÓN DE
LA ACTIVIDAD DE
LODOS DE DIGESTIÓN
ANAEROBIA Y SU
INFLUENCIA SOBRE LA
REDUCCIÓN DE
PRODUCCIÓN DE LODOS**

**Trabajo Final de Máster
“Gestión Integral del Agua”**

Pablo María Romero Pareja



**“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LODOS DE DIGESTIÓN
ANAEROBIA Y SU INFLUENCIA SOBRE LA REDUCCIÓN DE
PRODUCCIÓN DE LODOS”**

**Memoria presentada por el alumno Pablo María Romero Pareja como Trabajo
Final de Máster Oficial en “Gestión Integral del Agua” (Perfil Investigador) de la
Universidad de Cádiz.**

Fdo. Pablo María Romero Pareja

VºBº, Directores del Periodo de
Investigación

Fdo.: Dra. Dolores Coello Oviedo

Fdo.: Dr. Carlos A. Aragón Cruz.

Departamento de Tecnologías del Medio Ambiente.

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales.

Cádiz, a 25 de Noviembre de 2011

ÍNDICE

Tabla de contenido

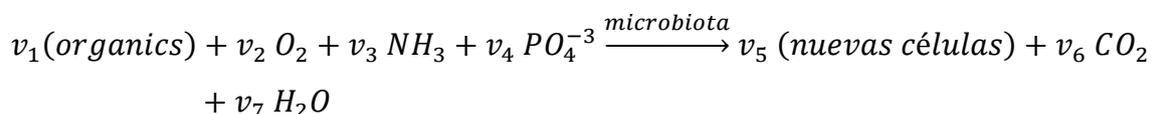
1. Introducción y objetivos	1
2. Antecedentes.....	5
2.1 El sistema de lodos activos.	5
2.2 Estrategias para la reducción en origen de la producción de lodos de depuradora	7
2.2.1 Presentación de las distintas estrategias.	7
2.2.2 Introducción a la adición de material enzimático para la reducción de la producción de lodo en exceso.....	9
3. Material y Métodos.....	12
3.1 Plan de trabajo.	12
3.1.1 Montaje experimental.	12
3.2 Preparación de reactivos y extractos.....	15
3.2.1 Agua residual sintética.....	16
3.2.2 Extractos	16
3.3 Técnicas analíticas utilizadas.....	18
3.3.1 Técnicas empleadas para el seguimiento de los reactores en discontinuo.	18
3.3.2 Técnicas empleadas para la determinación de las actividades enzimáticas y del contenido de ARN de los extractos.	20
4. Resultados y discusión	27
4.1 Estimación de la tasa de crecimiento en un reactor de lodos activos convencional.....	28
4.2 Evaluación del efecto de la adición de lodo de digestión anaerobia sobre la tasa de crecimiento de un sistema de lodos activos.....	30
4.3 Evaluación del efecto de la adición de extractos procedentes de lodo anaerobio sobre la tasa de crecimiento de un sistema de lodos activos convencional.....	35
4.3.1 Adición del sobrenadante de un lodo anaerobio ultrasonificado y centrifugado (ANUC) y de un lodo anaerobio centrifugado (ANC).	36
4.3.2 Evaluación del efecto de la adición de extractos procedentes de lodos de digestión anaerobios y aerobios sobre la tasa de crecimiento de un sistema de lodos activos convencional.....	42

5. Conclusiones.....	49
6. Bibliografía.....	51

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La eliminación de materia orgánica y de nutrientes por medio de la oxidación biológica es considerada la técnica de depuración de aguas residuales más viable desde el punto de vista económico. Pero esto sólo sería así de simple si el sistema biológico fuera capaz de eliminar la contaminación del agua y, a su vez, de generar volúmenes inferiores de biomasa en exceso de la que produce realmente. En la depuración de aguas residuales por medio de la oxidación biológica actúa un ecosistema microbiano muy complejo compuesto de bacterias, protozoos, metazoos, virus, gusanos, helmintos... que lleva a cabo una degradación secuencial de la materia orgánica seguida de un proceso de nitrificación, desnitrificación y de eliminación de fósforo. Además, para que todos estos subprocesos se puedan llevar a cabo, se deben cumplir una serie de requisitos: crecimiento efectivo de la biomasa, “baja” demanda química de oxígeno (DQO), un alto contenido en oxígeno disuelto y un elevado tiempo de retención del fango para la nitrificación. Para la secuencia de desnitrificación, se requerirán condiciones contrarias: suficiente DQO y ausencia de oxígeno disuelto. Este proceso, conjunto orquestado de microprocesos, es un *modus vivendi* difícil de optimizar, o incluso, de lograr (*Metcalf and Eddy*, 2003).

Resumiendo, el proceso completo consiste en la conversión de diferentes componentes de las aguas residuales (materia orgánica y nutrientes), por medio de la oxidación y la reducción, en productos finales, concretamente CO_2 , H_2O , N_2 y nuevas células. Este proceso se podría expresar con la siguiente ecuación:



Dónde v_i sería un coeficiente estequiométrico.

Todo este proceso degradativo de la materia orgánica genera una cantidad de biomasa de entre 0,4-0,5 kg SVS/kg DQO, que son las “nuevas células” de la ecuación anterior. La biomasa generada en cantidad superior a la necesaria para mantener una población microbiana adecuada en el sistema de lodos activos, constituye, junto con otros componentes, los denominados lodos de depuradora.

El tratamiento sostenible del lodo residual de la depuración de aguas es aquel por el que se cumplen los requisitos de reciclaje eficiente de recursos sin que ello suponga un trasvase de sustancias perjudiciales al ser humano o al medio ambiente. (*Directiva del Consejo Europeo 91/271*). Debido al enorme volumen de los lodos generados por la depuración de aguas, de 15 a 100l /kg DBO₅ consumida en sistemas convencionales de lodos activos, (por ejemplo, una ciudad como Cádiz tiene que gestionar anualmente el fango que cabría en un campo de fútbol de 100 metros de altura) la gestión y destino final de los mismos son materias de gran importancia. Sin un vertido fiable del lodo, el actual concepto de depuración del agua es insostenible (*Khurshed et al., 2011*). De acuerdo con la Normativa Vigente, se establece que todas las aglomeraciones urbanas, independientemente de su tamaño, deben depurar eficientemente sus aguas residuales, lo que está ya suponiendo un incremento vertiginoso en el volumen de agua residual que se tiene que depurar así como el volumen de lodos en exceso producidos. En Europa, la cantidad de lodo generado a principios de siglo era de 90 gramos de peso seco por persona y día, y la tasa de generación de estos residuos se prevé que aumente a un ritmo de hasta más de de 10 Mt/año (*Werther y Ogada, 1999*). Además, hay que tener en cuenta las restricciones legales en materia de vertido de lodo de depuradora o a su uso en agricultura y en la industria energética como combustible en incineradoras, que se han publicado en los países desarrollados, como son las emitidas por el congreso de los EEUU en la enmienda a la ley de Conservación y Recuperación de Recursos de 1976, (*RCRA 1984, HSWA, 1984*), o en Europa en la Directiva 86/278, que limita el uso de lodos de depuradora con fines agrícolas o la ya mencionada Directiva 91/271 que prohíbe su emisión al mar . También es importante, aparte de la restricción legal, la baja aceptación social que tiene el uso de los lodos de depuradora o sus derivados como abono agrario o la incineración como fuente de energía. Por todo lo anterior, se puede entender que la depuración de aguas es considerada como una de las necesidades básicas en una sociedad desarrollada por motivos ecológicos y de salubridad, pero que , sin embargo, genera un residuo muy voluminoso y difícil de gestionar. La importancia que actualmente posee la gestión y el tratamiento de los lodos de depuradora en el ámbito del saneamiento y depuración se pone de manifiesto, por ejemplo, en la producción de artículos científicos relacionados con ella. De hecho, se ha observado un incremento notable del número de publicaciones relativas a los lodos de depuradora: de los 83 artículos de media por año en la década de los 90 hasta los 239 que de media se editan actualmente. En definitiva, la gestión y sobre todo la reducción de la producción

de fangos es un tema que ha cobrado tanta importancia en la disciplina del tratamiento de aguas como la de los procesos en sí (Horan, 1990). Actualmente, la gestión de los lodos, y en general la de todos los residuos, se orienta hacia la reducción del residuo en su origen. Esta opción es considerada como la alternativa prioritaria en la gestión de los residuos de acuerdo con la *Directiva* 08/98, frente a las estrategias de vertido, recuperación, reciclaje y revalorización (*Reduce-Reuse-Recycle-Recovery-Disposal*).

Son múltiples las estrategias para la reducción de la producción de lodos en exceso descritas en la bibliografía científica (Khursheed et al., 2011). Estas estrategias son presentadas en el apartado 2.2.1 del presente capítulo. Algunas de estas estrategias se basan en alterar el metabolismo microbiano potenciando las rutas degradativas y limitando el crecimiento celular. Otras tienen su base en la solubilización de los fangos, y otras en el establecimiento de compartimentos ecológicos correspondientes a organismos depredadores de bacterias. En el presente estudio se investigará sobre la influencia que tienen materiales biológicos procedentes de los procesos de digestión de fangos sobre la producción de biomasa en un proceso convencional de lodos activos. En concreto la técnica seleccionada se engloba dentro de un grupo de estrategias basadas en la lisis celular y el crecimiento críptico del fango.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Comprobar si la aplicación directa de lodo anaerobio, y más concretamente, del complejo enzimático asociado a este material, permite reducir la producción de biomasa en un sistema de depuración de lodos activos.
 - A tal efecto, se estudiará en discontinuo el efecto que tiene sobre la producción de lodos en exceso, la adición de dos distintas fracciones de lodo de digestión anaerobia sin tratar.
- Evaluar posibles tratamientos de acondicionamiento del lodo anaerobio para incrementar la actividad enzimática del mismo y comprobar su efecto sobre la tasa de crecimiento del fango activo.
 - Para ello, se añadirán a las unidades de lodos activos en discontinuo dos extractos procedentes de la centrifugación de fango de digestión anaerobia, habiendo sido ultrasonificada previamente una de las dos fracciones. Se determinará la variación en la tasa de crecimiento, tanto en el reactor de referencia como en los sistemas con extracto añadido.

- Comparar la actividad enzimática contenida en fangos aerobios y anaerobios y el efecto de su adición sobre reactores de lodos activos, y más concretamente, sobre la producción de lodos.
 - En este caso, se añadirá al sistema en discontinuo sendos extractos ultrasonicados, pero uno procedente de la digestión anaerobia y otro de la digestión aerobia.

2. ANTECEDENTES.

2.1 EL SISTEMA DE LODOS ACTIVOS.

En nuestro estudio, nos centramos en el proceso específico de oxidación biológica basado en la tecnología de lodos activos. La tecnología de lodos activos junto con el lagunaje y la digestión aerobia de lodos, son los principales procesos de tratamiento de agua en suspensión. Esta tecnología promueve el desarrollo de un cultivo en suspensión de microorganismos aerobios capaces de llevar a cabo la degradación de la materia orgánica biodegradable tanto coloidal como disuelta presente en el agua residual, en conformidad con la expresión recogida en la Introducción (página 1).

La tecnología de lodos activos (o fangos activados) es la tecnología más extendida para el tratamiento de aguas residuales. Se pueden diferenciar dos etapas:

- Etapa de aireación: tiene lugar en el tanque (o cuba) de aireación y en ella se promueve el cultivo microbiano en suspensión por medio de una apropiada aireación (mínimo de $1 \text{ mgO}_2/\text{L}$) y el aporte de nutrientes, que es la contaminación del agua. Los microorganismos degradan y asimilan la materia orgánica disuelta.
- Etapa de decantación: en ella se lleva a cabo la sedimentación de los lodos generados en la primera etapa.

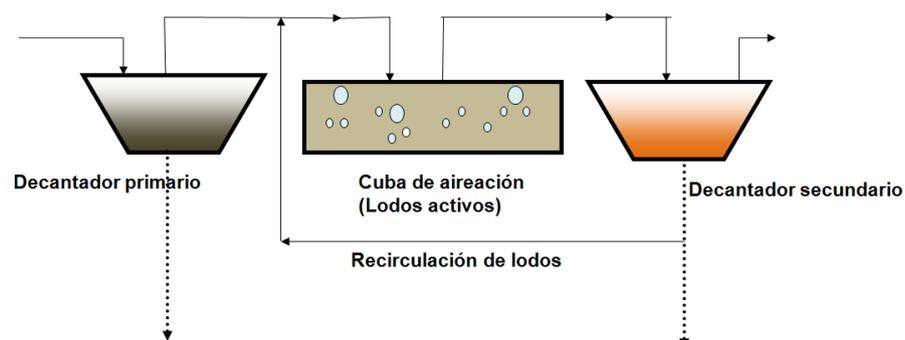


Figura 2.1.-Esquema del proceso de lodos activos

Hay que aclarar que previamente a estas dos etapas existe un acondicionamiento previo o pretratamiento, basado en operaciones de tipo físicas. El decantador primario forma parte siempre de esta primera fase. Así mismo, no se especifica la existencia de otras unidades que podrían formar parte del esquema de la instalación (terciario).

En condiciones en las que los nutrientes y el oxígeno aportado al reactor aerobio no son limitantes, la actividad microbiana, el consumo de materia orgánica y el crecimiento de nueva biomasa alcanzan velocidades realmente notables. Un factor importante, aparte de la aireación, que se debe de procurar en el sistema de lodos activos es el de una correcta homogeneización. De esta forma se evitan problemas de acumulación de materia y se facilita el contacto biomasa-alimentación.

Los fangos se generan en dos puntos del esquema de una planta de depuración de lodos activos. Por una parte, en el decantador primario se encuentra el lodo más pesado. Estos lodos tienen un contenido en materia orgánica del 60-70% y son de difícil asimilación microbiana por su tamaño. Son volúmenes putrescibles. Tienen un tono gris y un contenido en agua del 95-99%. El otro punto donde se concentran los lodos generados es el decantador secundario. Los microorganismos, en el seno de la cuba de aireación, desarrollan a partir de la degradación de la materia orgánica del vertido, funciones de síntesis y de mantenimiento celular. Esta biomasa creada se suma al volumen de materia procedente de organismos no activos, aumentando la concentración de sólidos en el reactor. Estos sólidos pasan en el seno de la corriente de la planta al decantador secundario y allí precipitan por gravedad. Una fracción de los mismos se recircula a la cuba de aireación para mantener en ella una microbiota activa adecuada, pero otra (los "lodos en exceso") pasan a constituir la purga. Estos lodos, están parcialmente degradados y no tienen un olor tan desagradable. Tienen un color marrón.

Si se unen los fangos de sendos decantadores se obtiene el fango mixto. Este fango residual tiene una concentración de sólidos del 1-5% en peso. Estos sólidos están compuestos de residuos del agua residual entrante, de biomasa sintetizada, nitrógeno orgánico e inorgánico, fósforo, metales pesados (Zn, Ni, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb, As) trazas de orgánicos como pesticidas, PAHS, dioxinas, fenoles, bifenilos policlorados...y microbio como bacterias, virus, patógenos...Algunos componentes son beneficiosos (fósforo) pero otros son peligrosos sólo por su presencia o por su concentración. En general, el lodo, dado su alto contenido orgánico, puede entrar con facilidad en

putrefacción por lo que es preciso que sean sometidos a un tratamiento adecuado en la misma planta de depuración o por medio de un gestor. Las distintas unidades que suelen formar parte del proceso de tratamiento de lodos son:

- **Espesamiento.** Busca reducir la cantidad de agua en el seno del fango. Las técnicas para llevarlo a cabo son la sedimentación por gravedad, la flotación y la centrifugación.
- **Estabilización:** su objetivo es reducir la cantidad de materia orgánica contenida en el fango. Se puede dar en un digestor (aerobio o anaerobio), por medio de una estabilización química o por compostaje.
- **Acondicionamiento.** Busca eliminar el agua intersticial y compactar aún más los sólidos.
- **Deshidratado.**
- **Transporte.**

Como ya se indicó en la introducción, no es el tratamiento de los lodos y su posterior gestión como residuo la opción preferente en su manejo. Entre otras cosas, se trata de una solución bastante costosa, pudiendo llegar a suponer el 65% del coste operativo de la planta de depuración (*Zhao and Kugel, 1997*). Por tanto, la opción preferente debería ser su reducción en origen. Para conseguir esta reducción en la producción de fango se proponen varias estrategias algunas de las cuales se detallan en el apartado siguiente.

2.2 ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN EN ORIGEN DE LA PRODUCCIÓN DE LODOS DE DEPURADORA

2.2.1 PRESENTACIÓN DE LAS DISTINTAS ESTRATEGIAS.

El estudio que se ha desarrollado a nivel mundial con el objetivo de conseguir una reducción efectiva en la cantidad de lodos generados en los procesos de lodos activos y conforme a la dinámica y la naturaleza de los procesos que se dan en ella, se ha diversificado en diferentes líneas de actuación sobre el sistema.

En general, las estrategias se han clasificado en dos grupos (*Pérez-Elvira et al., 2006*):

1) Procesos cuyo objetivo es la reducción del crecimiento neto de la biomasa en el seno del la cuba de aireación (*Aragón, 2008*).

a) Crecimiento críptico (*lysis-cryptic growth*).

El fundamento de esta técnica es la lisis celular y la posterior biodegradación del material citoplasmático. Tras la rotura de la membrana celular, el contenido citoplasmático es vertido al medio constituyendo un aporte autóctono a la carga propia del agua residual. Tras ser consumida por los microorganismos en la cuba de aireación, esta materia orgánica es incorporada al ciclo respiratorio y parte de la misma se libera como CO₂, lo que revierte en una reducción en la producción global de biomasa. El crecimiento de la biomasa originado por el consumo de este material autóctono se denomina “crecimiento críptico” (*Mason CA. et al., 1986*). Los métodos recogido en la bibliografía para la desintegración, lisis y solubilización del fango son los siguientes:

i) Oxidación química.

(1) Ozono (*Chu L. et al., 2009*)

(2) Cloro (*Chen GH. et al., 2001*).

(3) Reactivos *Photo-Phenton* (*Tokumura M. et al., 2009*).

ii) Ultrasonidos y cavitación (*He J. et al., 2011*).

iii) Termo y tratamientos termo-químicos (*Pazoki M. et al., 2010*).

iv) Procesos de alta concentración de oxígeno (*Abbassi B. et al., 2000*).

v) Reacciones enzimáticas. Aplicación de enzimas hidrolíticas (*Ødegaard H. et al., 2004*).

b) Control de la edad del fango y del tiempo de retención hidráulico (*Martinage V. and Paul E., 2000*).

En un sistema de lodos activos en régimen estacionario, el tiempo de retención de fango es inversamente proporcional a la tasa específica de crecimiento (kg SVS/kg DQO). Esta reducción en la producción de fangos en exceso puede estar motivada por la presencia en el reactor de microorganismos superiores favorecida por el alto grado de madurez del fango. También el aumento del tiempo hidráulico de residencia provoca un descenso en la tasa de crecimiento. Esta estrategia requiere de bajas cargas de contaminación y prolongados tiempos de aireación.

c) Desacoplamiento del metabolismo.

Esta estrategia está basada en la teoría del desacoplamiento del metabolismo (*Low E.W. and Chase H.A.*, 1999), según la cual en determinadas ocasiones los microorganismos no ajustan el nivel de energía obtenido a través del catabolismo mediante los procesos anabólicos. Bajo determinadas condiciones ambientales para los microorganismos (presencia de ciertos compuestos orgánicos, metales pesados, temperaturas anómalas, ciclos alternos de aerobiosis-anaerobiosis) se produce una disociación entre las rutas catabólicas y anabólicas. En estos casos, parte de la energía, medida en ATP, obtenida de la degradación de la materia orgánica (catabolismo) no se emplea para el crecimiento celular (anabolismo) sino que se pierde en reacciones no asociadas al crecimiento o como calor. Esto provoca una reducción en la producción de fangos en exceso. Son varias las estrategias que, basadas en el desacoplamiento metabólico, han conseguido una reducción en la cantidad de fangos en exceso generado. A continuación se nombran algunas de ellas:

- i) Desacopladores químicos (CU). Por medio de diferentes mecanismos, se impide que la cadena respiratoria no genere nuevas moléculas de ATP (*Aragón CA. et al.*, 2009).
- ii) Oxid-Settling-Anaerobic process (OSA) Se introduce una cámara anóxica en la línea de recirculación de los fangos que produce una reducción en la producción de fangos en exceso. Los mecanismos que causan esa reducción aún no están establecidos (*Ye F. et al.*, 2010).
- iii) Empleo de oxígeno puro.
- d) Predación de bacterias.

Se basa en el control de las comunidades de microorganismos en el sistema de lodos activos y está basado en el hecho de que en la conversión de materia orgánica a biomasa de bacterias y de bacterias a biomasa de organismos superiores (protozoos, metazoos) ocurre una pérdida de energías, debido a que esta conversión no es 100% eficiente (*Hendrickx T.L.G. et al.*, 2010).

2) Procesos con bajo crecimiento.

- a) Tratamiento anaerobio del fango. (*Jung S-J. et al.*, 2006)

2.2.2 INTRODUCCIÓN A LA ADICIÓN DE MATERIAL ENZIMÁTICO PARA LA REDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LODO EN EXCESO.

La experimentación llevada a cabo en el presente trabajo se fundamenta en la estrategia de la fomentación de reacciones enzimáticas en el seno de la cuba de aireación para potenciar la lisis celular y el crecimiento crítico del lodo activo (“Reacciones enzimáticas”, en el anterior esquema). Esta tecnología busca favorecer la solubilización del fango y de la materia orgánica coloidal y particulada mediante la incorporación de un material con elevada actividad enzimática. En diferentes estudios se ha empleado como material enzimático, el extracto resultante de la digestión aeróbica de lodo o bien directamente, dosis de preparados comerciales de enzimas (*Aragón, 2008, Parmar et al., 2001*). En las condiciones que se dan en la digestión, la célula viva, que se encuentra en inanición, excreta al exterior material enzimático. En el caso que nos ocupa, se empleará como fuente de material enzimático un lodo de digestión anaerobia que, además, en un caso será tratado con ultrasonidos para intentar aumentar el contenido enzimático a añadir.

De acuerdo a *Burguess (2008)* las enzimas hidrolasas, responsables del paso limitante de la hidrólisis de macromoléculas, se encuentran igualmente en el lodo anaeróbico y en el aeróbico. La acción de tales enzimas es fundamental, ya que la membrana celular sólo permite el paso de moléculas de peso inferior a 1000 Da (*Cadoret et al., 2001*). Una vez traspasa la membrana celular, las moléculas de menor tamaño ya pueden ser empleadas como fuentes de carbono y energía. Si se favorece la solubilización de los fangos por medio de un incremento de la actividad hidrolasa en el medio (bulk), se reduciría la cantidad de materia no degradada en el fango residual y por tanto, los lodos en exceso generados en la instalación.

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y las células forman bioagregados, como son los biofilm y los flóculos. En estos entramados se encuentran inmovilizadas casi todas las enzimas extracelulares (*Frolund et al., 1995*). Es un hecho ampliamente documentado que los ultrasonidos pueden desintegrar la matriz de EPS que conforman los flóculos de los lodos y liberar así proteínas extracelulares, polisacáridos y enzimas. (*Yu et al., 2008*) Así, se ha comprobado que el tratamiento con ultrasonidos, mejora la digestión aerobia debido a la presencia de mayor cantidad de enzimas (*Ding et al., 2006*). Pero es más, parece ser que no sólo es la mera liberación al medio de las enzimas lo que acrecienta la solubilización de la materia orgánica, sino que en sí, los ultrasonidos mejoran la actividad biológica de las bacterias (*Tiehm et al., 2001*). Este es, entonces, el fundamento de la técnica que se desarrolla en el presente estudio para la extracción de material enzimático, no de un lodo de digestión aerobia sino de un lodo de

digestión anaerobia para ver la eficacia del extracto resultante en la reducción de producción de lodos en exceso. A su vez, los resultados obtenidos de la adición de este extracto serán comparados con los de la adición al sistema de lodos activos de un lodo anaerobio sin tratar y de un extracto de un lodo anaerobio únicamente centrifugado y, también, con los obtenidos de la adición de un extracto ultrasonificado de un lodo de digestión aerobia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente apartado se muestran las distintas etapas del plan de trabajo realizadas para alcanzar los objetivos fijados en el apartado de Introducción así como las técnicas analíticas desarrolladas en dicho estudio.

3.1 PLAN DE TRABAJO.

El objetivo principal del trabajo ha sido investigar en qué grado la adición de un lodo digerido biológico (anaerobio o aerobio), tratado o no, influye sobre la tasa de crecimiento de un sistema de lodos activos. De forma paralela a este estudio se han desarrollado técnicas de caracterización enzimática con el objetivo de identificar los materiales biológicos adicionados en los diferentes ensayos. A continuación se muestran las etapas diferenciables y secuenciadas que se han seguido para la consecución de los objetivos anteriormente expuestos:

- Estimación de la tasa de crecimiento en un reactor de lodos activos convencional.
- Evaluación del efecto de la adición de lodo de digestión anaerobia sobre la tasa de crecimiento de un sistema de lodos activos convencional.
- Evaluación del efecto de la adición de extractos procedentes de lodo anaerobio sobre la tasa de crecimiento de un sistema de lodos activos convencional.
 - Adición del sobrenadante de un lodo anaerobio ultrasonificado y centrifugado (ANUC) y de un lodo anaerobio centrifugado (ANC).
 - Evaluación del efecto de la adición de extractos procedentes de lodos de digestión anaerobia y aerobia sobre la tasa de crecimiento de un sistema de lodos activos.

Para la determinación de la generación de fango en cada una de las etapas, se ha seguido el protocolo de finido en el siguiente apartado.

3.1.1 MONTAJE EXPERIMENTAL.

El método empleado para el seguimiento de los sistemas en discontinuo es común para los distintos ensayos llevados a cabo. La diferencia entre ellos estriba únicamente en la composición de los reactores.



Figura 3.1-Sistema de cinco reactores en discontinuo.

Cada ensayo consta de cinco reactores de vidrio con una capacidad de 1,5 l (Figura 3.1). El fango empleado como inóculo procede de la EDAR “El Trocadero” (Puerto Real), concretamente de la línea de recirculación del sistema de lodos activos. El fango recogido de la instalación se lleva al laboratorio donde se diluye con agua tamponada (Tampón fosfato 0,2 M pH 7,6) hasta una concentración de sólidos en suspensión totales de 3-4g/l., valor típico de un sistema de lodos activos convencional (Metcal & Eddy, 2003). Una vez diluido, el fango se deja en aireación durante 24 horas para que se estabilice la biomasa

Un determinado volumen de este fango diluido y aireado se añade a cada reactor. El porcentaje, en volumen, del contenido de los reactores en los diferentes ensayos se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3.1-Composición de los reactores en los diferentes ensayos

Reactor	1	2 y 3		4 y 5*	
Ensayo lodos activos convencional	100% lodo aerobio	100% lodo aerobio		100% lodo aerobio	
Ensayo lodo Anaerobio	100% lodo aerobio	90% lodo aerobio	10% lodo anaerobio	70% lodo aerobio	10% lodo anaerobio
Ensayo con extracto de lodo anaerobio ultrasonicado y centrifugado (ANUC) y de lodo anaerobio centrifugado (ANC).	100% lodo aerobio	90% lodo aerobio	10% extracto anaerobio centrifugado	90% lodo aerobio	10% extracto anaerobio ultrasonicado y centrifugado
Ensayo con extracto de lodo anaerobio ultrasonicado y centrifugado (ANUC) y de lodo aerobio ultrasonicado y centrifugado (AUC).	100% lodo aerobio	90% lodo aerobio	10% extracto aerobio ultrasonicado y centrifugado	90% lodo aerobio	10% extracto anaerobio ultrasonicado y centrifugado

*El primer ensayo se hizo con cuatro reactores.

Cada uno de los reactores dispone de un sistema de aireación y agitación electromagnética, garantizando la mezcla completa del licor y su oxigenación.

El seguimiento de los reactores en discontinuo se realiza a tiempo inicial, tiempo 0, 2 horas, 5 horas y 24 horas. El tiempo inicial es el tiempo previo a la adición del agua residual sintética (ARS). El tiempo 0 horas es justo tras la adición del ARS.

La recogida de datos y muestras para cada uno de los tiempos se realiza siguiendo los siguientes pasos:

- Los reactores se inoculan con el porcentaje de fango correspondiente, de acuerdo con la Tabla 3.1. Así, por ejemplo, el reactor de referencia se inocula con 1,5 litros de fango (100% del reactor), mientras que el reactor con un 10% en volumen de extracto, con 1,35 l, esto es, el 90%.

- Adición de los diferentes extractos hasta completar los 1,5 l...
- A continuación se procede a la medida de SOUR y a la toma de muestras para el tiempo inicial:
 - Se toma el reactor y se homogeneiza.
 - Se toma una muestra para medir la tasa específica de respiración (SOUR)
 - Mientras se mide el SOUR, se toman unos 25mL del contenido del reactor y se recogen en un vaso de análisis debidamente rotulado al que se añade cuatro gotas de ácido sulfúrico para poder conservar la muestra y realizar posteriormente la medición de la DQO y de los sólidos en suspensión.
 - Tras la medición del SOUR, el fango empleado se devuelve al reactor.
 - Se vuelve a colocar la aireación y se pasa al siguiente reactor.
- Con todos los reactores se procede de la misma forma. Es importante lograr el máximo de homogeneización en los reactores antes de tomar la muestra para la medición del SOUR y para guardar en el vaso esterilizado.
- Las muestras recogidas se llevan al frigorífico.
- Se dejan en aireación todos los reactores durante 2 horas.
- Pasado este tiempo, se procede a la adición del agua residual sintética concentrada, preparada siguiendo la receta de la página 16. A cada reactor se añadirán 4 mililitros de ARS, de forma que se garantiza que en los reactores de referencia se tiene una DQO en torno a 450 mgO₂/L. Esta es la DQO habitual en la cuba de aireación de un proceso de depuración de lodos activos para un nivel medio de contaminación, (Hernández, 2001). La adición del ARS se hace al mismo tiempo que se toma la muestra del tiempo 0. Se procede de acuerdo a las siguientes etapas:
 - Se toma el reactor 1 o blanco.
 - Se añade 4 mililitros de ARS en dicho reactor
 - Se homogeneiza el reactor.
 - Se le introduce de nuevo la aireación y se deja durante 30 segundos.
 - Se procede de acuerdo a lo apuntado para la medida de SOUR y la toma de muestras en el tiempo inicial.
 - Se procede igualmente para todos los reactores.

3.2 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y EXTRACTOS.

3.2.1 AGUA RESIDUAL SINTÉTICA.

Se realiza de acuerdo con la siguiente receta.

Tabla 3.2- Receta del Agua residual sintética

Receta del ARS (500mL)
<i>BOE num. 260</i>
80 g. de peptona
15 g. de urea
55 g. de extracto de carne
3,5 g. de NaCl
2 g. de CaCl ₂ •H ₂ O
1 g. de MgSO ₄ •7H ₂ O
14 g. de K ₂ HPO ₄

Se consigue con esta receta una DQO de 350.000mgO₂/L

3.2.2 EXTRACTOS

Con el fin de determinar su influencia sobre la generación de biomasa en el proceso de depuración de fangos activados, en los diferentes ensayos se emplean los siguientes extractos que aparecen en la Figura 3.2.

Sobrenadante de la centrifugación de un lodo de digestión anaerobia (ANC). Con la adición de este extracto, se quiere evaluar la influencia de las enzimas que están dispersas en el medio (bulk) sobre la generación de fangos en el sistema de lodos activos convencional.

Sobrenadante de la centrifugación de un lodo de digestión anaerobia que previamente ha sido también tratado con ultrasonidos (ANUC). Con el tratamiento de ultrasonidos, se logra romper la red flocular del lodo y liberar las enzimas que están asociadas a los mismo.

Sobrenadante de la centrifugación de un fango de digestión aerobia que previamente ha sido también tratado con ultrasonidos (AUC). Se emplea este extracto ultrasonicado para determinar si la naturaleza de las enzimas asociadas a un lodo aerobio permite

reducir la tasa de crecimiento del sistema de lodos activos en comparación con el extracto ultrasonicado del anaerobio.

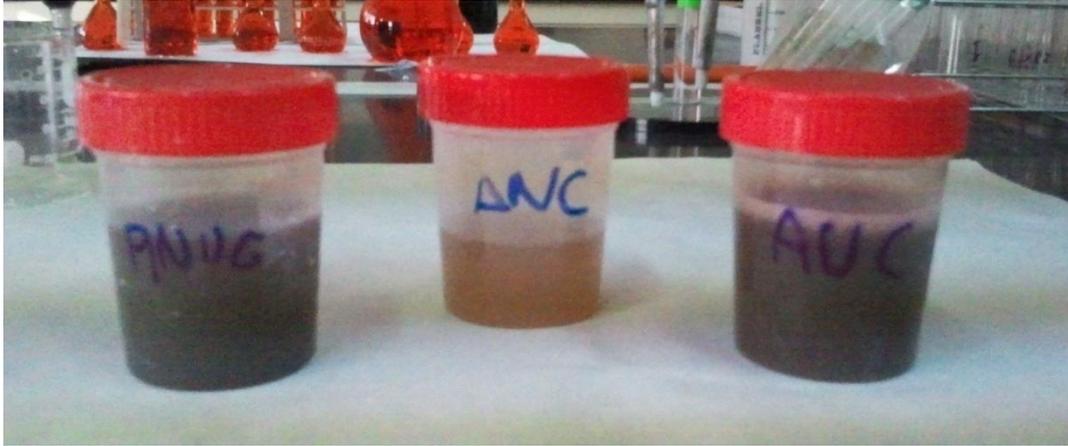


Figura 3.2-Imagen de los diferentes extractos estudiados. Nótese el aumento de turbidez anotado por Yan et al., (2010)

A continuación se detalla el procedimiento seguido para la obtención de obtiene cada uno de estos extractos anteriormente nombrado

3.2.2.1 Anaerobio Centrifugado (ANC)

Se toma la purga de un reactor de digestión termofílica situado en la misma facultad donde se realizan los ensayos. El contenido se lleva directamente a centrifugación. El equipo empleado en esta experimentación es de la marca Orto, modelo Tornox. A continuación, se llenan los tubos de la centrífuga en el equipo y se someten a un ciclo de centrifugación de 40 minutos a 3600 rpm. Después y sirviéndose de una pipeta esterilizada, se toma el sobrenadante de cada uno de los recipientes hasta tener el volumen necesario para el ensayo. Antes del proceso es importante calcular qué volumen de purga y de centrifugado hace falta para el ensayo. El extracto se mantiene en vasos esterilizados y se llevan al laboratorio donde se llevará a cabo el ensayo en discontinuo. Otra fracción del mismo se reservará para los ensayos de actividad enzimática.

3.2.2.2 Extracto Anaerobio Ultrasonicado y Centrifugado (ANUC)

Para obtener el extracto Anaerobio Ultrasonicado y Centrifugado inicialmente se toma la muestra procedente de la purga de un reactor de digestión anaerobia que opera en rango termofílico. A continuación se toman diferentes fracciones homogeneizadas de la muestra de 400 mL, que se llevan al vaso de acero dónde el fluido se somete a un proceso de ultrasonidos. Previamente se ha comprobado que ese volumen es suficiente para que la caña de los ultrasonidos esté inmersa en el lodo. El equipo que se emplea es de la marca Hielscher UP 400S con el que trabajamos a una potencia de 400W. El vaso metálico tiene una camisa por la que fluye agua a 19°C. Para mantener esta temperatura del fluido se emplea un baño termostático VWR modelo 1156D. El fango anaerobio se expone al de ultrasonidos durante un periodo de 25 minutos. Una vez finalizado el pretratamiento con ultrasonidos el material obtenido se somete a un proceso de centrifugación para eliminar las partículas en suspensión y obtener un sobrenadante con las características deseadas.

3.2.2.3 Extracto Aerobio Ultrasonicado y Centrifugado (AUC)

Para la obtención de este extracto, se tomó muestra procedente de una unidad de digestión aerobia de lodos situada en la EDAR de “El Torno” en Chiclana de la Frontera. A continuación, la muestra biológica se dejó en aireación durante 24 horas con el objetivo de eliminar la materia orgánica que pudiera existir en la misma. Posteriormente el método desarrollado para la obtención del extracto fue el mismo que el descrito en el apartado anterior (3.2.2.2).

3.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS.

A continuación se presentan las distintas técnicas empleadas en el estudio. Se pueden clasificar en dos tipos:

- Técnicas empleadas para el seguimiento de los reactores en discontinuo.
- Técnicas empleadas para la determinación de las actividades enzimáticas y de la biomasa de los extractos.

3.3.1 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LOS REACTORES EN DISCONTINUO.

3.3.1.1 Tasa específica de respiración (Specific Oxygen Uptake Rate, SOUR)

La tasa de respiración específica expresa la actividad respiratoria de la biomasa presente en un determinado medio. Sin embargo, se limita a la actividad aerobia, esto es, que consume oxígeno. Es una medida indirecta que se obtiene mediante la siguiente fórmula (Awong *et al.*, 1995):

$$SOUR = \frac{1440 \cdot R}{C_{SVS}}, mgO_2/(g SVS \cdot día)$$

R es la tasa de consumo de oxígeno (Oxygen uptake rate, OUR)

C_{SVS} es la concentración de biomasa, (Sólidos Volátiles en Suspensión de la muestra, SVS).

La medida de la SVS se detalla en el apartado 3.3.1.3. Para la determinación del OUR, se procede siguiendo los siguientes pasos (APHA, 1992):

- Se toman 100 mL de la muestra (fango) y se vierten en un frasco de pyrex, de forma que quede enrasado. El frasco tiene además en su interior un imán agitador. Especial atención se prestará a la homogeneización del reactor del que se toma la muestra para garantizar la representatividad de la medida.
- Se deja reposar el frasco unos segundos para que desaparezcan las posibles burbujas que se hayan podido formar en la superficie.
- Se cierra el frasco con un tapón roscado perforado y adaptado con una junta tórica que permite introducir la sonda del oxímetro en el interior del recipiente de forma estanca, es decir, sin que entre o salga aire.
- Se introduce la sonda del oxímetro. En nuestro estudio se ha empleado un equipo de la casa WTW modelo oxi330i/SET. Se sitúa el frasco sobre un agitador que, en nuestro caso, ha funcionado a 900 rpm en todas las medidas
- A continuación y pasados unos instantes hasta que se estabiliza la medida de oxígeno, se toman durante un tiempo (normalmente 6 minutos) los valores concentración de O₂ y tiempo de medida. Muy frecuentemente, antes de que acabara dicho periodo de tiempo, el sistema había llegado a la anoxia, condiciones de baja concentración de oxígeno libre.
- Se abre el frasco y se recupera el volumen, vertiéndolo en el reactor.

Para el cálculo del OUR, se representan los valores de concentración de oxígeno frente al tiempo. A continuación, se obtiene la recta de la pendiente mediante el método estadístico de mínimos cuadrados. Esta pendiente expresa el consumo de oxígeno por unidad de tiempo y volumen, $\text{mgO}_2/(\text{l}\cdot\text{día})$.

3.3.1.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO).

La DQO nos indica la materia orgánica presente en el agua. El método determina por vía química (dicromato potásico en medio ácido) la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica (APHA, 1992). En la experimentación se medirá la DQO soluble, que es la DQO del filtrado a $0,45\mu\text{m}$.

3.3.1.3 Sólidos Totales y Volátiles en Suspensión (STS y SVS)

La medida de los sólidos volátiles es un método de determinación de la biomasa presente en el agua. Es un proceso aproximado ya que no distingue entre células vivas, biomasa muerta y partículas orgánicas no viables (Liwarska *et al.*, 2003) Se realiza de acuerdo a los métodos expuestos en la tesis de Aragón (2009).

3.3.1.4 Tasa de crecimiento (Y_{OBS}).

La variable que expresa la mayor o menor generación de fangos en el proceso depurativo es la tasa de crecimiento observada Y_{obs} , cuya ecuación es la siguiente:

$$Y_{\text{obs}} = \frac{\Delta \text{SVS (mg/l)}}{\Delta \text{DQO}_{\text{consumida}}(\text{mg/l})}$$

Esta tasa relaciona la cantidad de biomasa generada con la DQO consumida (materia orgánica degradada). Para ello se toman las medidas iniciales (tiempo 0) y finales de DQO y de SVS de cada uno de los reactores. Esta variable se expondrá al final de los resultados de cada uno de los estudios en discontinuo

3.3.2 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y DEL CONTENIDO DE ARN DE LOS EXTRACTOS.

Estos ensayos miden la actividad tanto de enzimas extracelulares (glucosidasa, proteasa, esterasa) como intracelulares (deshidrogenasas) de los extractos que se añaden al sistema de lodos activos. De éstas y otras enzimas (fosfatasas, amilasas) se valen las comunidades microbianas para la hidrólisis y la mineralización de la materia orgánica presente en el medio. Además, para la caracterización de los lodos sin tratar y de los extractos, se ha introducido un método que determina la cantidad de ARN (*Liwerska et al.*, 2001), para cuantificar el contenido de biomasa en el medio como método alternativo a la SVS.

Tanto unas como otras medidas nos servirán en este estudio para caracterizar los diferentes extractos que se añaden a las unidades de depuración en discontinuo. A partir de los resultados de estas caracterizaciones y de los de los ensayos de producción de biomasa en los diferentes reactores, se podrá establecer la influencia de una mayor actividad enzimática sobre la reducción de la producción de la biomasa, tal como proponía la estrategia a la que se hizo mención en el capítulo de Antecedentes (Página 7).

3.3.2.1 Enzimas extracelulares.

Actividad α -Glucosidasa

Estas enzimas hidrolizan los disacáridos maltosa y sacarosa (*Goel et al.*, 1998)

Para su determinación, se mezclan 1 mililitro de la muestra que se quiere analizar y 2 mililitros de disolución tampón 0.2M Tris-HCl buffer (pH 7,6) en tubos de microbiología de vidrio. A continuación se agita el contenido a 150 rpm. La reacción se inicia con la adición de 1mL de la disolución sustrato que previamente ha debido de atemperarse a 36°C para que el inicio de la hidrólisis sea inmediato. Esta disolución es de 0.1% (w/v) de p-nitrofenil- α -d-glucopiranosido preparada en tampón 0.2 Tris-HCl, pH 7,6. Esta disolución es estable durante 2 meses en frigorífico. El vial se mantiene en oscuridad a 37°C. Pasado un tiempo que se debe de anotar, la reacción se detiene por inmersión de los tubos en agua hirviendo durante 5 minutos. Después de centrifugar a 2500g durante 5 minutos, se lee la absorbancia del sobrenadante a 410 nm. La actividad de la α -glucosidasa se calcula con la siguiente expresión:

$$AEE_{glu} = \frac{74,8 \cdot Abs_{\lambda} \cdot v_a}{v_s \cdot C_{SVS} \cdot t} \cdot F$$

AEE_{glu} es la actividad específica de la α -glucosidasa, expresada en μ moles p-nitrofenil- α -d-glucopiranosido / (min·g SVS),

Abs_{λ} , es absorbancia a 410 nm,

v_a es el volumen del ensayo (4 mL),

v_s es el volumen de la muestra en el ensayo, (1 mL)

C_{SVS} es la concentración de biomasa, g/L,

t, tiempo incubación, minutos,

F es el factor adimensional de la dilución de la muestra.

Actividad Proteasa

Las proteasas son también enzimas hidrolasas, que rompen enlaces peptídicos de las proteínas dando origen a péptidos de menor tamaño (*Goel et al.*, 1998)

Se toman de la muestra 3mL y se ponen en tubos de cristal. A estos, se añade 1mL de la disolución 0,5% w/v de Azocaseína realizada en tampón fosfato pH 7,6. La disolución de Azocaseína se prepara en el mismo día. La mezcla resultante, tras agitarse en un vortex de forma vigorosa, se mantiene a 37°C durante un tiempo determinado que se tiene que controlar y anotar (90 minutos en nuestros ensayos). Transcurrido dicho tiempo se añaden 2 mililitros de TCA y se centrifuga. Del sobrenadante se toman 2 mL que se mezclan con otros 2 mililitros de disolución 2M NaOH. La mezcla resultante se mide espectrofotométricamente a 440nm.

. La actividad de la proteasa se calcula con la siguiente expresión:

$$AEE_{pro} = \frac{35,31 \cdot Abs_{\lambda} \cdot v_a}{v_s \cdot C_{SVS} \cdot t} \cdot F$$

AEE_{glu} es la actividad específica de la proteasa, expresada en μ moles azocaseína/(min·g SVS),

Abs_{λ} , es absorbancia a 440 nm,

v_a es el volumen del ensayo (4 mL),

v_s es el volumen de la muestra en el ensayo, (3 mL)

C_{SVS} es la concentración de biomasa, g/L,

t, tiempo incubación, minutos,

F es el factor adimensional de la dilución de la muestra.

Actividad Esterasa.

Las esterases son enzimas inespecíficas que catabolizan la degradación de enlaces ésteres presentes en polímeros (*Fontevieille et al.*, 1992). La actividad se basa en la medida espectrofotométrica de la fluoresceína, molécula que se forma cuando las enzimas rompen el enlace éster del diacetato de fluoresceína (FDA). El procedimiento del ensayo se muestra a continuación.

Se toman 2 mililitros de lodo a analizar y se diluye con 10 mililitros de una disolución tampón fosfato 0,1M, pH 7,6. Se somete la mezcla a vortex durante 15 segundos. Un mililitro de esta disolución se mezcla con 4 mL de tampón salino frío (por inmersión en un baño con hielo). Se adiciona a continuación 0,1mL de una disolución 4,8mM de diacetato de fluoresceína (FDA) en acetona. La disolución substrato se ha de mantener a -20°C. Transcurridos 10 minutos, se detiene la reacción añadiendo 1 mL de disolución 0,4g/L de $HgCl_2$. Se realiza un último centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos de forma previa a la medida del sobrenadante a 490nm. Al sacar de la centrífuga se pueden volver a situar los tubos en hielo para prevenir en lo posible el desarrollo de la degradación, de cualquier forma, es importante hacerlo todo con celeridad porque el FDA se sigue degradando.

Empleamos la siguiente expresión:

$$AEE_{est} = \frac{Abs_{\lambda}}{81,5} \cdot \frac{1}{t} \cdot v_4 \cdot \frac{v_2}{v_3} \cdot \frac{1}{v_1} \cdot F \cdot \frac{1}{C_{SVS}},$$

AEE_{EST} es la actividad específica de la esterasa, en $\mu\text{moles FDA}/(\text{min} \cdot \text{g SVS})$,

Abs_{λ} , es absorbancia a 490 nm,

V_1 es el volumen de muestra inicialmente empleado (2 mL),

V_2 es el volumen resultante de la muestra y el tampón salino (12 mL),

V_3 es el volumen de la mezcla anterior que se toma para medir la actividad (1 mL),

V_4 es el volumen final de cuando se ha añadido el HgCl_2 (6,1 mL),

C_{SVS} es la concentración de biomasa, g/L,

t, tiempo incubación, minutos,

F es el factor adimensional de la dilución de la muestra.

3.3.2.2 Enzimas intracelulares.

Actividad Deshidrogenasa, (DHA)

Son un conjunto de enzimas intracelulares con una función clave dentro de los ciclos catabólicos de las células. El método espectrofotométrico usado es el descrito en el artículo de *López et al.*(1985) y se basa en una medida del color que se produce en la reducción del cloruro de 2-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolium (INT) a INT-formazán (INTF). Usualmente, se ha empleado esta actividad cuando el último aceptor de electrones, al que sustituye el INT, era el oxígeno. De hecho, esta actividad viene expresada en $\text{mg O}_2 / (\text{g SVS} \cdot \text{día})$. Sin embargo, y así viene expresado en el artículo de *López* (1985), este término de oxígeno molecular tendría, más bien, un sentido de equivalencia redox ya que existe la posibilidad de usar esta medida de actividad para ambientes en los que el oxígeno no es el último aceptor de electrones. En estos casos es más corriente expresar la medida en unidades de $\mu\text{molINTF}/(\text{g SVS} \cdot \text{día})$ (*Mauriness-Carboneill et al.*, 1998). En este artículo se aclara que la fermentación vía succinato, propia del genero *Bacteroides*, reduce la molécula de INT a INTF cuando ésta ocupa el puesto del fumarato, que es el habitual aceptor de electrones (*Brock et al.*,1994). Esto se debe a que los potenciales redox fumarato-succinato y del INT-ubiquinona son muy parecidos (0,03 V y 0,10 V) y la transferencia podría darse frecuentemente. *Awong* (1985) confirma por otra parte que la actividad DHA está íntimamente relacionada con la oxidación de la materia orgánica y, por lo tanto, con la biomasa activa. A continuación se detalla la técnica analítica.

Se hace una disolución de INT 3,95mM en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,6. Se toman 5mL de la muestra y se mezcla con 0,5mL de la disolución de INT. Se deja 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después de lo cual se añade 1mL de disolución 37% de formaldehído. De aquí se toman 2 mililitros y meten en tubos de centrífuga. Se realiza una centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Se retira el

sobrenadante. A continuación se añade de 5 a 10 mililitros de etanol al 95% (Barragán, 2004) según la concentración de la muestra. En este momento se puede someter la muestra a ultrasonidos hasta que se dejen de apreciar flóculos de formazán coloreados. También se puede dejar durante un tiempo determinado dejando que transcurra la extracción. Es importante en todo momento proteger los tubos de la luz. De nuevo se somete a centrifuga y finalmente se mide el sobrenadante resultante a 490 nm. El blanco es etanol.

$$AEE_{DHA} = \frac{1024 \cdot Abs_{\lambda} \cdot v_a}{v_e \cdot C_{SVS} \cdot t} \cdot F,$$

AEE_{DHA} , actividad específica de la deshidrogenasa, expresada en $mg\ O_2^*/(g\ SVS \cdot día)$;

* O_2 equivalente, en adelante se omite,

Abs_{λ} , es absorbancia a 490 nm,

C_{SVS} es la concentración de biomasa, g/L,

t, tiempo incubación, minutos,

F es el factor adimensional de la dilución de la muestra.

v_e volumen de etanol empleado, mL

v_a , volumen ensayo, mL

3.3.2.3 Determinación de ARN en el medio

Método para la determinación del ARN (*Liwerska-Bizukojc et al.*, 2001). En el estudio del crecimiento microbiológico y de la formación de productos, la medida del contenido de ARN celular es una buena medida de la actividad de la biomasa (*Benthin et al.*, 1991; *Esener et al.*, 1989). Habiendo demostrado una mayor precisión que la medida de los sólidos volátiles en suspensión (*Liwerska et al.*, 2001)

Se toman 5 mililitros de la muestra y se lava 3 veces con 3 mililitros de disolución fría de 0,7M de $HClO_4$. El lavado consiste en la adición de los 3 mililitros de disolución ácida, centrifugación a 3000rpm durante 10 minutos y deshecho del sobrenadante resultante. Posteriormente, se añaden 3 mililitros de disolución 0,3M de KOH. Se

mantienen los tubos en oscuridad durante 60 minutos a 37°C con ocasional mezclado. Después se centrifuga nuevamente a 3000rpm durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante, mientras que el precipitado se lava de nuevo dos veces con 3 mililitros de disolución fría de 0,5M de HClO₄. Este procedimiento es el mismo de los anteriores lavados, pero en este caso, el sobrenadante se toma. El volumen obtenido de las tres extracciones (KOH y dos de 0,5M HClO₄) se lleva a 15 mL añadiendo si es preciso disolución 0,5M de HClO₄. De nuevo se centrifuga. El sobrenadante se mide a 260 nm. El blanco es 0,5M de HClO₄.

Se tiene la expresión siguiente para el cálculo de la concentración de ARN:

$$C_{ARN} = \frac{Abs_{\lambda} \cdot M_w}{\epsilon} \cdot F$$

C_{ARN}, concentración de ARN, g/L

M_w, peso molecular medio del ARN, 340 g/mol

F es el factor adimensional de la dilución de la muestra.

ε: 10800 mol•cm⁻¹

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La reducción de la producción de fangos en el proceso de depuración con lodos activos es el objetivo final del presente estudio. Como se vio en el apartado de Antecedentes, entre las diferentes estrategias para alcanzar este objetivo, está la técnica consistente en promover las reacciones enzimáticas en el seno de la cuba de aireación y, de esta forma, solubilizar parcialmente el fango y la materia orgánica particulada y coloidal (*Pérez-Elvira et al.*, 2003). Para ello, es necesario aportar al sistema enzimas hidrolíticas (proteasas, glucosidasas, lipasas, etc.), las cuales actuarán rompiendo los polímeros de cadena larga aumentando su biodisponibilidad.

El empleo directo de enzimas comerciales puede suponer un elevado coste por lo que es conveniente buscar procesos alternativos en los que generar estas enzimas. En este sentido, durante la digestión de lodos se excreta al medio gran cantidad de material citoplasmático y enzimas. Tal y como se ha descrito en el capítulo de Introducción y Objetivos, es objeto de este estudio recuperar las enzimas producidas durante la digestión y evaluar el efecto de su adición sobre la producción de fangos en un sistema de lodos activos. Con tal fin, se realizan los ensayos detallados en el plan de trabajo descrito en el capítulo de Material y Métodos (Página 12).

En cada uno de los apartados en los que se divide este capítulo, se presentarán, en primer lugar, los resultados de la caracterización enzimática del extracto obtenido del fango digerido para, posteriormente, analizar el comportamiento de los reactores de lodos activos tras la adición de dichos extractos.

Como ya se indicó en el capítulo de Material y Métodos, la variable Y_{obs} (Página 20) nos indica la tasa de generación de fango en el proceso depurativo, relacionando la biomasa generada (ΔSVS , g/L) con la eliminación de materia orgánica (ΔDQO , mgO₂/L). Este será uno de los parámetros determinantes en este estudio ya que permitirá evaluar la reducción de la producción de lodos en cada uno de los ensayos planificados.

4.1 ESTIMACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO EN UN REACTOR DE LODOS ACTIVOS CONVENCIONAL.

El objeto del primer ensayo realizado ha sido estudiar la producción de lodos en un sistema de lodos activos convencional. Para ello se emplearon cuatro reactores de 1,5 litros de capacidad cada uno de ellos. El procedimiento de ensayo seguido viene definido en el apartado correspondiente del capítulo de Material y Métodos (en la página 18).

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de sólidos en suspensión a lo largo del ensayo

Tabla 4.1.- Evolución de los sólidos en suspensión a lo largo del ensayo.

Sólidos	Inicial	0 horas	2 horas	5 horas	24 horas
Suspendidos, g/L					
Totales ¹	2,52(0.015)	2,6(0.022)	2,71(0.031)	2,73(0.018)	2,75(0.022)
Volátiles ¹	1,97(0.035)	2,08(0.0195)	2,15(0.024)	2,23(0.015)	2,24(0.011)

1.-Valor promedio. Entre paréntesis, SD

La concentración de los sólidos en suspensión en los reactores aumenta a lo largo del periodo de estudio, lo cual es lógico, ya que se realiza un aporte de materia orgánica fácilmente biodegradable. Los microorganismos asimilan esta fuente de alimento y la aprovechan para crecer, lo que es detectado como un incremento en la biomasa del sistema (SVS). Concretamente, el incremento en sólidos volátiles suspensión es del 8% al finalizar el ensayo de 24 horas (de 2,08 a 2,24 g/L).

En la Figura 4.1 se representa la evolución de la cantidad de materia orgánica soluble presente en el reactor así como la tasa específica de respiración que muestran los microorganismos a lo largo del ensayo.

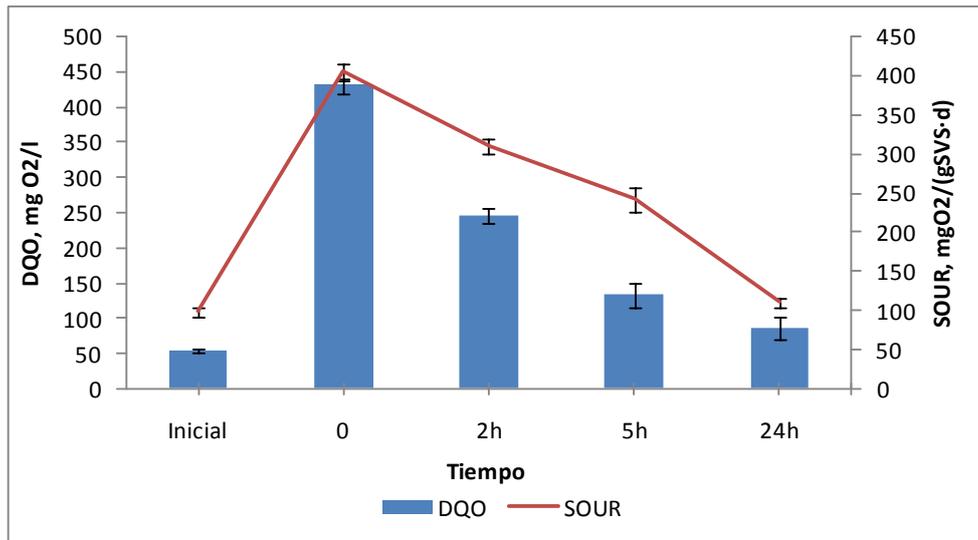


Figura 4.1.- Evolución de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y de la tasa específica de respiración (SOUR) in el ensayo.

En la figura se puede observar el importante incremento que se produce en la tasa de respiración al ser adicionada la fuente de materia orgánica (ARS), en concreto los valores de este parámetro pasan desde 98 mgO₂/(SVS·d) hasta un valor de hasta 405 mgO₂/(SVS·d), a la vez que el valor de la DQO registra su valor máximo de 240 mgO₂/L (inmediatamente después de la adición del ARS). Este aumento en la actividad se debe a que la biomasa, tras haber permanecido en aireación durante 24 horas sin adición de ningún sustrato (en *starvation*), recibe con la adición del ARS, un gran aporte de materia orgánica fácilmente degradable. Después, la tasa de respiración va disminuyendo a medida que los microorganismos van consumiendo la materia orgánica disponible en el medio, hasta llegar a un valor de 100 mgO₂/(SVS·d). Al final del ensayo, el valor de la DQO soluble en los reactores es levemente superior al valor inicial (antes de la adición del ARS). Esto puede deberse a que la biomasa presente en el fango no puede degradar la materia orgánica refractaria. La reducción de la DQO, considerando el valor máximo alcanzado al adicionar el ARS, es del 77% (SD:0,14)

En la Tabla 4.2 se presenta el valor promedio de la tasa de crecimiento, Y_{obs} , del fango activo obtenido en este ensayo.

Tabla 4.2.- Tasa de crecimiento observada en el sistema convencional de lodos activos

	SVS ₂₄ -SVS ₀ , mg/L	DQO _{24h} -DQO ₀ , mgO ₂ /L	Y _{OBS} , mgSVS/mgDQO
Sistema convencional ¹	160	286,90	0,558

1.-Valor promedio

El valor de la tasa de crecimiento obtenido en este ensayo es similar a determinado por diferentes autores en sistemas convencionales de fangos activos (0,55-0,65 mg SVS/mg DQO, *Ramalho*, 1996)

4.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE LODO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO DE UN SISTEMA DE LODOS ACTIVOS.

El objetivo de este ensayo ha sido el de estudiar la influencia que posee la adición de fango anaerobio procedente de un sistema de digestión sobre la producción de biomasa en un reactor de lodos activos discontinuo. En este ensayo, se aplicó el fango anaerobio sin ningún tipo de tratamiento previo de acondicionamiento, para así comprobar si las enzimas generadas y excretadas por las células al medio durante la digestión anaerobia del fango tienen efecto sobre la tasa de crecimiento del lodo activo.

Para la realización de este estudio se emplearon cinco reactores, siendo el procedimiento el descrito en el apartado de Material y Métodos.

Uno de los reactores se utilizó como blanco o reactor de referencia, mientras que a los cuatro reactores restantes se les añadió distintos porcentajes de lodos procedente de la digestión anaerobia. En la figura se muestra un esquema del procedimiento experimental empleado en el ensayo.

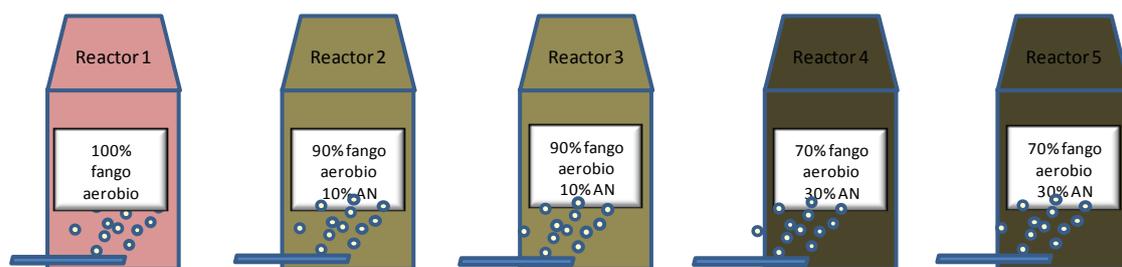


Figura 4.2.- Concentración de los distintos reactores del ensayo de Producción de biomasa en un proceso depurativo de lodos activos con adición de lodo anaerobio sin tratamiento previo (AN)

Se muestran, en primer lugar, los resultados de los ensayos de actividad enzimática realizados sobre el lodo anaerobio sin procesar. A modo comparativo, en la misma tabla se incluyen los datos de actividad medidos en el fango aerobio (A) empleado como inóculo de los reactores, aunque en este caso sin diluir. Asimismo, se presentan los datos de DQO y SS de ambos tipos de lodos.

Tabla 4.3.-Valores del estudio de actividad enzimática, contenido en SVS, DQO y ARN de los extractos empleados.

			Lodo aerobio	Lodo Anaerobio
ARN, mg/L			135,74	297,71
Actividad enzimática	Extracelulares	α -Glucosidasa, μ moles p-nitrofenil- α -d-glucopiranosido / (min·g SVS)	1,67	2,33
		Esterasa, μ molesFDA/(min·grSVS)	2,38	0,37
	Intracelulares	Deshidrogenasa, , mgO ₂ / (g SVS·dia)	22,37	33,53
DQO, mgO ₂ /L			910	8060
SVS, g/L			9,30	18,20

Los valores obtenidos de ARN son del orden de los registrados por *Liwarska et al.*, (2003) y *Benthin* en 1991. El valor determinado del contenido en ARN del lodo anaerobio es mayor que el del aerobio, lo cual es debido a que éste posee una mayor concentración de sólidos en suspensión y consecuentemente en microorganismos. Si se dividen estos valores por los SVS medidos en sendos extractos se obtiene que la concentración de ARN en el fango aerobio es igualmente mayor, 14,59 mg ARN/g SVS y en el anaerobio 16,36 mg ARN/g SVS.

La actividad deshidrogenasa, propia del metabolismo primario, es también mayor en el lodo anaerobio que en el aerobio. El dato obtenido para el lodo aerobio está dentro del intervalo de valores determinado por el estudio realizado por *Barragán* (2004). En su trabajo los valores de actividad deshidrogenasa para un fango de digestión aerobia oscilaron entre 22 y 35 mgO₂/(g SVS•día))

La actividad esterasa, como se comentó anteriormente, es indicativa de la actividad metabólica secundaria propia de la estabilización de un sistema cuando se consumen las reservas energéticas. Los valores de la relación actividad deshidrogenasa/ actividad esterasa en el lodo anaerobio es superior que en el lodo aerobio, esto es característico de sistemas en los que existen aún recursos fácilmente metabolizables, hecho que indica que el reactor del que procede no había conseguido una estabilización de los fangos ya que existe aún mucha materia (*Barragán*, 2004).

Como conclusión del este estudio previo, podemos decir que el lodo anaerobio **sin tratar** presenta una elevada actividad intracelular si la comparamos con el lodo aerobio. Pero no presenta elevada actividad enzimática en el medio. Esto podría deberse a que las bacterias aún no han excretado mucho material enzimático al medio al no haber estado sometidas de forma prolongada a un estado de inanición. Hecho que estaría en consonancia con la conclusión del anterior párrafo en relación a que el reactor no habría llegado aún a estabilizar el fango completamente. Es por tanto un material, el lodo anaerobio, con concentración muy alta en sólidos, en biomasa y con una actividad enzimática en el medio mayor que el lodo aerobio .

En la tabla siguiente se muestra la evolución de los sólidos en suspensión en los reactores.

Tabla 4.4.- Sólidos en suspensión registrados a lo largo del ensayo

Sólidos en suspensión	STS, g/L			SVS, g/L		
	Blanco	10% AN ¹	30% AN ²	Blanco	10% AN ¹	30% AN ²
Inicial	3,03	6,15(0.063)	9,97(0.058)	2,32	4,13(0.050)	7,08(0.025)
0 horas	3,10	5,93(0.024)	9,08(0.056)	2,45	4,18(0.068)	6,75(0.047)
2 horas	3,32	6,02(0.036)	9,34(0.027)	2,58	4,45(0.021)	7,61(0.057)
24 horas	3,35	6,13(0.044)	9,42(0.030)	2,66	4,59(0.058)	7,74(0.087)

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5 Entre paréntesis, SD

A partir de los resultados mostrados en la tabla anterior se puede observar la alta concentración de SS que mostraron los reactores a los que se adicionó el fango procedente de digestión anaerobia desde el inicio del ensayo, lo cual tuvo, como se mostrará a continuación efectos negativos sobre el sistema.

La tendencia descrita por la variable sólidos en suspensión a lo largo del ensayo fue creciente para todos los reactores. El incremento de sólidos volátiles en suspensión que tiene lugar en los reactores a lo largo del ensayo fue del 8,57% para el reactor de referencia, mientras que para los reactores a los que adicionó un 10 y un 30 % de lodo el incremento fue del 9,94% y del 14,67% respectivamente.

En la Tabla 4.5 se muestran los valores de materia orgánica soluble presente en el reactor a lo largo del ensayo así como la tasa específica de respiración que mostraron los microorganismos en el mismo.

Tabla 4.5.- Evolución de la Demanda Química de Oxígeno y de la tasa específica de respiración a lo largo del ensayo

	DQO, mgO ₂ /L			SOUR, mgO ₂ /(d SVS·d)		
	Blanco	10% AN ¹	30% AN ²	Blanco	10% AN ¹	30% AN ²
Inicial	82,61	822,81 _(5,91)	2476,55 _(16,51)	108,77	*	*
0 horas	467,62	1191,53 _(10,36)	2802,34 _(21,13)	520,00	*	*
2 horas	154,67	543,56 _(7,38)	1453,56 _(11,46)	281,36	307,49 _(15,10)	320,73 _(6,15)
24 horas	123,23	306,35 _(6,27)	548,64 _(2,57)	111,08	154,54 _(7,36)	156,34 _(6,88)

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5 Entre paréntesis, SD

En los reactores que contenían el mayor contenido en lodo anaerobio (es decir R3 y R4), se produce, desde el momento inicial, un importante consumo de oxígeno que impide determinar la tasa específica de respiración. Este elevado consumo de oxígeno es debido probablemente al aporte de materia orgánica biodegradable que supone la adición del lodo anaerobio. En efecto, mientras el valor de materia orgánica soluble en el reactor de referencia en el tiempo inicial era de 80 mgO₂/L, en los reactores R2-R3 y R4-R5 fue de 820 mgO₂/L y 2500 mgO₂/L respectivamente. Debido a estos altos valores de DQO al inicio del ensayo en los reactores a los que se adicionó el fango anaerobio de digestión, la adición de ARS no supuso un incremento notable en los reactores a los que se adicionó el fango anaerobio de digestión, la adición de ARS no supuso un incremento

notable en la carga másica de dichos reactores. Así, mientras que en los reactores con un 10% de lodo anaerobio sin pretratar, el aumento de DQO no superó el 50% (de 820 a 1190 mgO₂ /l), en el reactor blanco, fue cuatro veces y media mayor (de 80 a 470 mgO₂/l) tras añadir el sustrato.

En la Tabla 4.6 se muestran los rendimientos obtenidos en lo que se refiere a la eliminación de la materia orgánica. Se puede observar en esta tabla que todos los reactores presentaron un notable rendimiento, observándose mayores tasas de eliminación de materia orgánica en los reactores en los que se adicionó el lodo anaerobio. Posteriormente, en todas las unidades la DQO descendió paulatinamente.

Tabla 4.6.- Porcentajes de eliminación de la DQO

Reducción	Blanco	10% AN	30% AN
DQO, %	73,65	74,29	80,42

En lo que respecta a los valores de tasa específica de respiración (Tabla 4.5), se puede comprobar que el valor de este parámetro al final del periodo es similar para todos los reactores, lo que parece indicar que los microorganismos han consumido la mayor parte de la materia orgánica fácilmente biodegradable.

Con el objetivo de comprobar el efecto que el lodo anaerobio tiene sobre la producción de biomasa a continuación se muestran los valores de tasa de crecimiento obtenidos para cada uno de los reactores ensayados.

Tabla 4.7 Tasa de crecimiento en cada uno de los reactores ensayados

	SVS ₂₄ -SVS ₀ , mg/L	DQO _{24h} -DQO ₀ , mgO ₂ /L	Y _{OBS} , mgSVS/mgDQO
Blanco	210	344,39	0,61
10% AN ¹	420	885,18	0,47
30% AN ²	990	2253,17	0,44

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5

A pesar de que el incremento en SVS es cinco veces mayor en el sistema con el 30% de lodo anaerobio que en el sistema de referencia, la tasa de crecimiento en aquel sistema

es menor (0,44 frente a 0,61 mg SVS/mg DQO). Se produce, por tanto, una reducción en la producción de biomasa del 33%. No obstante, la adición directa de lodo anaerobio sobre el fango activo, presenta una serie de inconvenientes, los cuales se pasan a enumerar a continuación:

- La adición de estos fangos aporta gran cantidad de sólidos, tanto volátiles como totales, dificultando el manejo a escala de laboratorio debido a la formación de agregados.
- Se observa un elevado incremento de la demanda de oxígeno disuelto en el sistema que, a efectos prácticos, supondría aumentar el suministro de aire al sistema y, consecuentemente, el consumo energético y los costes de explotación.

Estas limitaciones propician que se descarte el empleo de lodos anaerobios sin procesar para reducir la tasa de crecimiento o producción de biomasa en un sistema de lodos activos convencional.

4.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS PROCEDENTES DE LODO ANAEROBIO SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO DE UN SISTEMA DE LODOS ACTIVOS CONVENCIONAL.

El primer ensayo de este apartado compara la influencia que sobre la producción de biomasa en un sistema de lodos activos tiene la adición de dos extractos procedentes de un lodo anaerobio. Uno de los extractos se obtiene del fango anaerobio tras haber sido sometido a ultrasonidos y, posteriormente, a centrifugación. Este tratamiento rompe el entramado flocular del lodo y las enzimas que estaban asociadas al mismo se liberan al medio (*bulk*) (Yu *et al.*, 2008). Otra fracción del lodo anaerobio es únicamente centrifugado, no siendo recuperadas las enzimas que permanecen atrapadas en el flóculo.

En un segundo ensayo se compara la producción de fango en un sistema de lodos activos cuando se le añade dos extractos procedentes de fangos diferentes. Uno se obtiene al someter un fango de digestión anaerobio a ultrasonidos y el otro de la

ultrasonicación de un lodo de digestión aerobio. Se comprobará si la distinta naturaleza de las enzimas (procedentes de lodo aerobio y anaerobio) afecta a la producción de fango.

4.3.1 ADICIÓN DEL SOBRENADANTE DE UN LODO ANAEROBIO ULTRASONICADO Y CENTRIFUGADO (ANUC) Y DE UN LODO ANAEROBIO CENTRIFUGADO (ANC).

En este ensayo se quiere comprobar la influencia en la producción de fango cuando se usa un extracto procedente de lodo de digestión anaerobio tratado únicamente en la centrífuga (ANC) y de otro obtenido del fango anaerobio que, previamente a la centrifugación, ha sido sometido a ultrasonicación (ANUC). Los pretratamientos a los que ha sido sometido el fango de digestión anaerobia se detalla en el capítulo de Material y Métodos (página 16).

Para llevar a cabo esta experiencia se emplearon de nuevo cinco reactores de litro y medio cada uno de capacidad. En la Figura 4.3 se muestra un esquema de los reactores empleados en la realización del ensayo.

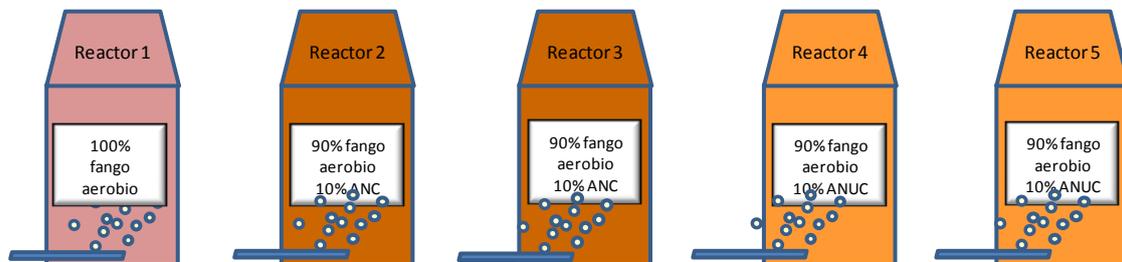


Figura 4.3 Esquema de los reactores empleados en la realización del ensayo

A continuación, en la Tabla 4.8 se muestran los datos de caracterización de los extractos añadidos procedentes del lodo anaerobio ultrasonicado y centrifugado.

Tabla 4.8.- Caracterización de los extractos ANC y ANUC añadidos

	Extracto ANC	Extracto ANUC
ARN, mg/L	6.51	49,82

Actividad enzimática	Extracelulares	Proteasa, $\mu\text{moles Azocaseina}/(\text{min}\cdot\text{g SVS})$	2,33	2,15
		α -Glucosidasa, $\mu\text{moles p-nitrofenil-}\alpha\text{-d-glucopiranosido}/(\text{min}\cdot\text{g SVS})$	9,83	18,83
		Esterasa, $\mu\text{moles FDA}/(\text{min}\cdot\text{g SVS})$	15,01	14,35
	Intracelulares	Deshidrogenasa, , $\text{mgO}_2/(\text{g SVS}\cdot\text{dia})$	76,02	28,77
DQO, mgO_2/L			8060	10200
SVS, g/L			0,50	1,25

De los resultados obtenidos en esta caracterización es importante tener en cuenta que los dos extractos que se añadirán a los reactores biológicos presentan una alta concentración de materia orgánica (medida como DQO), lo que provocará un importante aumento de la carga orgánica aplicada sobre los reactores biológicos

El extracto ANUC presenta una concentración más elevada de ARN que el ANC. Esto se debe a la lisis celular, causada por el tratamiento con ultrasonidos, que hace que parte del material celular pase al medio disperso. Liu y Fang (2003) emplearon de forma análoga, la medida de ADN para estimar el grado de rotura celular causado por un tratamiento de ultrasonidos. Para el lodo anaerobio sin tratar, cuyos resultados se mostraron en la Tabla 4.3, se comprobó que poseía un contenido en ARN de 297,71 mg/l, el cual es mucho mayor que el valor medido en los extractos ANC y ANUC. Este hecho se debe a la elevada concentración de sólidos volátiles en suspensión que presentan los lodos anaerobios sin ningún tipo de acondicionamiento Si se divide el valor de ARN obtenido entre la concentración de sólidos volátiles en suspensión de cada uno de los reactores (Tabla 4.9) se observa que la ratio varía considerablemente, determinándose que el mayor valor lo presentan el extracto ANUC.

Tabla 4.9 Valores de ARN por peso de sólido volátil en suspensión.

	Extracto ANC	Extracto ANUC
ARN, mg/g SVS	13,02	39,86

Valor análogo al obtenido por Yu (2008) para el ADN. El material ANUC, tiene más concentración de ARN por peso de sólidos volátiles en suspensión debido probablemente a que durante el proceso de ultrasonicación se ha solubilizado gran parte del contenido del material citoplasmático de las células (Yan *et al.*, 2010) lo que provoca un incremento en este valor. En el caso del extracto ANC el valor de ARN/gSVS es menor debido a que durante el proceso de centrifuga se produce la precipitación de todo el material celular.

La actividad de la enzima deshidrogenasa (DHA), que está relacionada con el transporte de electrones en el interior de la célula, es mayor en el extracto del fango anaerobio centrifugado. En el extracto ANUC, la ultrasonicación provoca la lisis y muerte celular y, consecuentemente, se produce el descenso en la DHA. En el artículo de Goel (1998) define que la DHA es nula para la fracción de fango ultrasonicada y centrifugada. No obstante, en dicho trabajo el extracto es sometido a una filtración posterior, reteniendo los sólidos en suspensión, pudiendo ser este el motivo de los bajos valores de DHA obtenidos en el mencionado trabajo.

En relación con las actividades de las enzimas extracelulares (glucosidasa, proteasa, esterasa), y si comparamos los valores obtenidos para el lodo anaerobio con el de sus extractos (Tabla 4.3 y Tabla 4.8), se observa que en el fango procesado la concentración es mayor. Esto confirma la eficacia de los ultrasonidos para la rotura de los flóculos y la consiguiente liberación de las enzimas asociadas a las mismas. El hecho de que en el extracto ANC, los valores de actividad sean también mayores que en el lodo sin tratar se debe a que los SVS decrecen en la centrifugación y el ratio actividad enzimática –peso de SVS es mayor. Por otra parte, hay que recordar, que al proceder este extracto de un lodo de digestión anaerobia, tiene una mayor cantidad de enzimas dispersas en el medio de las que tendría un lodo activo, por la excreción que realizan las células de material enzimático en condiciones de inanición. Estas enzimas sí se recogerían en el sobrenadante y aunque no sean muchas, como se apuntó en el apartado 4.2 cuando se comentaban los resultados de las caracterizaciones de los lodos sin tratar, su presencia es más notoria que en el medio disperso (*bulk*) del lodo anaerobio por la baja concentración en SVS. En el lodo anaerobio, la acción de las enzimas se ve impedida cuando existe gran cantidad de sólidos en suspensión. Los valores para los extractos

(ANUC y ANC) son parecidos, salvo para la glucosidasa que es marcadamente superior para el ANUC.

A continuación se muestran los resultados del seguimiento realizado sobre los reactores discontinuos.

En la Tabla 4.10 se muestra los valores obtenidos a diferentes tiempo de la concentración de sólidos en suspensión.

Tabla 4.10.- Concentración de Sólidos en suspensión a lo largo del ensayo .

Sólidos en suspensión	STS, g/L			SVS, g/L		
	Blanco	10% ANC ¹	10% ANUC ²	Blanco	10% ANC ¹	10% ANUC ²
Inicial	4,12	4,03(0.032)	4,52(0.084)	3,25	3,15(0.065)	3,64(0.048)
0 horas	4,22	4,18(0.064)	4,70(0.035)	3,40	3,30(0.057)	3,85(0.062)
2 horas	4,3	4,38(0.026)	4,81(0.046)	3,39	3,46(0.055)	3,89(0.036)
5 horas	4,48	4,63(0.069)	4,99(0.033)	3,47	3,54(0.016)	3,96(0.017)
24 horas	4,68	4,69(0.038)	5,01(0.084)	3,60	3,59(0.004)	4,02(0.056)

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5 Entre paréntesis, SD

Se puede destacar, en primer lugar, como el procesamiento del lodo anaerobio permite reducir el aporte de sólidos a los reactores discontinuos, de tal manera que su aplicación no supone un incremento elevado de la concentración de SVS del fango activo. Esto se debe, en el caso del ANUC, a la solubilización ocurrida por el tratamiento de ultrasonidos. El hecho de que en el ANC la SVS sea aún menor es porque gran parte de los sólidos en suspensión pasan al pellet y además no existe un nuevo aporte de SVS acontecida por la destrucción de flóculos como ocurre en el ANUC. Este hecho es observable en la Figura 3.2.

Se puede comprobar como en todos los reactores tiene lugar un incremento de los sólidos en suspensión (tanto los totales como los volátiles). Este incremento está provocado por el crecimiento que experimenta la biomasa al disponer de materia orgánica fácilmente biodegradable. El aumento en la concentración de los sólidos volátiles en suspensión en este ensayo en el reactor de referencia fue de 5,55% mientras que en los reactores con el extracto ANC fue del 8,79 % y en el reactor al que se adicionó ANUC el incremento en los sólidos volátiles en suspensión fue del 4,96 %.

En la Tabla 4.11 se muestran los resultados obtenidos en el seguimiento de los reactores empleados en este estudio en los parámetros de DQO y en la tasa específica de respiración que mostraron los microorganismos en cada uno de los reactores.

Tabla 4.11.- Evolución de la Demanda Química de Oxígeno y de la tasa específica de respiración a lo largo del ensayo

	DQO, mgO ₂ /L			SOUR, mgO ₂ /(d SVS·d)		
	Blanco	10% ANC ¹	10% ANUC ²	Blanco	10% ANC ¹	10% ANUC ²
Inicial	118,50	950,14 _(7,59)	1141,16 _(11,29)	140,01	610,97 _(7,56)	596,02 _(6,52)
0 horas	442,81	1309,15 _(14,69)	1595,00 _(24,36)	485,12	697,14 _(3,54)	576,64 _(8,15)
2 horas	231,85	729,37 _(6,84)	643,48 _(8,34)	212,08	560,09 _(2,98)	403,31 _(3,44)
5 horas	172,45	418,49 _(5,36)	541,67 _(3,47)	117,14	233,23 _(6,24)	246,75 _(0,39)
24 horas	124,50	353,59 _(2,17)	428,58 _(5,61)	89,60	135,36 _(1,26)	172,85 _(1,88)

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5 Entre paréntesis, SD

En los resultados obtenidos se puede observar el incremento que experimenta los valores de la tasa específica de respiración en el reactor blanco, en concreto el valor del SOUR aumenta desde un valor de 140 hasta 485 mgO₂/ (g SVS·d) al adicionar la fuente de materia orgánica fácilmente biodegradable. Este comportamiento también se repite en el reactor al que se adicionó el extracto ANC. Sin embargo, en los reactores a los que se adicionó el extracto ANUC tiene lugar un pequeño descenso del valor del SOUR. Este comportamiento podría deberse a que en el ANC la actividad respiratoria es mayor que en el ANUC (Actividad DHA en Tabla 4.8) y aunque el extracto representa únicamente el 10% del volumen del reactor, su efecto podría ser relevante ante la adición de sustrato fácilmente biodegradable. Durante el pretratamiento al que se somete el extracto ANUC se produce la muerte de prácticamente de todos los microorganismos presentes, mientras que en el extracto ANC sólo se produce la decantación de los microorganismos por el proceso de centrifugación al que son sometidos, siendo sin embargo, los microorganismos con menor peso capaces de mantenerse en el sobrenadante. No obstante, el comportamiento anómalo del sistema con ANUC en el SOUR podría deberse a una irregular toma de la muestra para la medida del mismo.

En el sistema con ANUC la tasa específica de respiración es mayor al término del ensayo (172 mgO₂/ (g SVS·d)). Esto se puede deber a que la acción del material

enzimático añadido con el ANUC facilita la degradación de una fracción mayor de materia orgánica por parte de la biomasa y que ésta se mantenga más activa aún, ya que a las 24 horas hay presente todavía bastante materia orgánica degradable (DQO: 430 mgO₂/l). A lo largo del ensayo, la mayor actividad respiratoria registrada en el sistema con extracto ultrasonificado provoca una mayor reducción de DQO. Así, en este sistema, la DQO desciende de 1595 mgO₂/l a 430 mgO₂/l, mientras que en el del sistema con ANC, de 1310 mgO₂/l a 350 mgO₂/l. Es decir, mientras que unos reactores se mide una reducción neta de DQO de 1165 mgO₂/l en el otro, de 960 mgO₂/l.

En la Tabla 4.12 se muestran los rendimientos obtenidos en cada uno de los reactores en la eliminación de la materia orgánica disuelta.

Tabla 4.12.- Porcentajes de eliminación de la DQO

Reducción DQO, %	Blanco	10% ANC	10% ANUC
	71,88	72,99	73,13

Con los parámetros mostrados anteriormente se puede calcular la tasa de crecimiento de cada uno de los reactores empleados en el estudio, con el objetivo de comprobar la influencia que los extractos pueden tener sobre la producción de la biomasa.

Tabla 4.13.- Tasa de crecimiento en cada uno de los reactores ensayados

	SVS ₂₄ -SVS ₀ , mg/L	DQO _{24h} -DQO ₀ , mgO ₂ /L	Y _{OBS} , mgSVS/mgDQO
Blanco	200	318,31	0,63
10% ANC ¹	290	955,56	0,30
10% ANUC ²	190	1166,42	0,16

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5

Conclusiones.

Los resultados obtenidos en este ensayo han permitido evidenciar que la tasa de crecimiento (Y_{obs}) del reactor al que se adicionó un 10% de ANUC registra un valor más bajo y, por tanto, los resultados más prometedores en la investigación realizada.

El extracto ANC aportó una mayor actividad de la biomasa inicial, pero la ultrasonicación a la que se sometió el ANUC posibilitó que en este medio existiera una mayor actividad enzimática que solubilizó en mayor grado la materia orgánica del sistema. Por tanto, se concluye que es más ventajosa la elección del extracto ANUC para lograr un mayor descenso en la producción de lodos en exceso.

4.3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS PROCEDENTES DE LODOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIOS Y AEROBIOS SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO DE UN SISTEMA DE LODOS ACTIVOS CONVENCIONAL.

En este apartado, se presentan los resultados de un ensayo, en el que se compara el efecto que sobre la tasa de crecimiento de un fango activo tiene la adición de los extractos obtenidos tras el procesamiento de lodos anaerobios y aerobios. En ambos casos, el material añadido es el sobrenadante obtenido tras la ultrasonicación y la centrifugación de dichos lodos.

Este ensayo servirá, por tanto, para identificar cuál de los extractos produce una mayor reducción en la producción de fangos en un sistema aerobio y evaluar su efecto sobre la operación del sistema (demanda de oxígeno, rendimientos en eliminación de materia orgánica, etc.). Al igual que en los ensayos anteriores, en este estudio, se volvieron a emplear cinco reactores de litro y medio de capacidad. La obtención de los dos extractos se realizó como se describió en el capítulo de Material y Métodos (Página 16)

La siguiente figura muestra un esquema del procedimiento experimental.

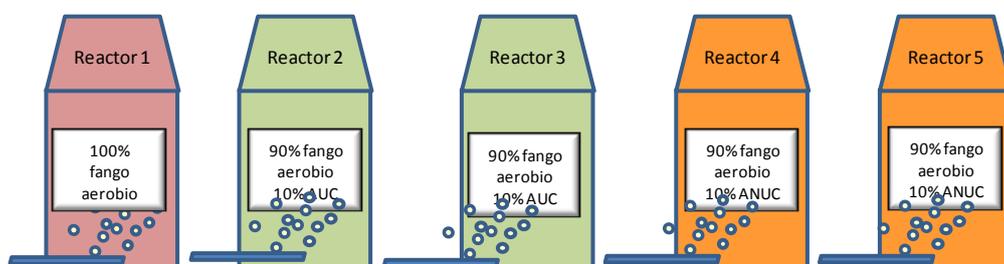


Figura 4.4.- Esquema de los reactores empleados en la realización del ensayo

A continuación, se exponen los resultados de los ensayos de caracterización de la actividad enzimática realizados sobre el extracto de ANUC y AUC.

Tabla 4.14.- Caracterización de los extractos AUC y ANUC añadidos.

			Extracto AUC	Extracto ANUC
ARN, mg/L			45,1	49,82
Actividad enzimática	Extracelulares	Proteasa, $\mu\text{molesAzocaseina}/(\text{min}\cdot\text{g SVS})$	1,93	2,15
		α -Glucosidasa, $\mu\text{moles p-nitrofenil-}\alpha\text{-d-glucopiranosido}/(\text{min}\cdot\text{g SVS})$	13,5	18,83
		Esterasa, $\mu\text{molesFDA}/(\text{min}\cdot\text{grSVS})$	12,08	14,35
	Intracelulares	Deshidrogenasa, , $\text{mgO}_2/(\text{g SVS}\cdot\text{dia})$	5,48	28,77
DQO, mgO_2/L			4230	10200
SVS, g/L			3,50	1,25

A partir de los resultados mostrados en la tabla anterior se puede destacar que existe semejanza entre los efectos que tiene la aplicación de los ultrasonidos en el lodo de digestión aerobia y anaerobia. Así, si se consultan los resultados obtenidos para el lodo anaerobio (Tabla 4.3) y se comparan con el de su extracto ultrasonificado (ANUC) y se hace lo mismo para el aerobio (Tabla 4.3) y el ultrasonificado del lodo de digestión aerobia (AUC) comprobamos que: los sólidos volátiles en suspensión se reducen en ambos extractos, en el caso del lodo anaerobio, desciende de 18,20 a 1,25 g/l y para el aerobio de 9,30 a 3,50 g/l. Esto puede deberse a la solubilización que produce el ultrasonido en el seno del medio donde se aplican (Yan *et al.*, 2010).

Todas las enzimas extracelulares tienen mayor actividad en los extractos (Goel *et al.*, 1998). Por el contrario, la actividad intracelular, caracterizada en la medida de la actividad de la deshidrogenasa, se ve reducida en los extractos. Esto se debe a que los ultrasonidos no sólo rompen la estructura flocular sino que afectan a la membrana celular causando la inactivación y la muerte de los microorganismos (este efecto ya se comprobó en el estudio realizado en el capítulo anterior de resultados y discusión). Además por los resultados obtenidos en la determinación del ARN se confirma que la

reducción de los SVS se debe principalmente por la reducción de la biomasa, dada la relación de ésta con la determinación del ARN.

La solubilización que produce el tratamiento de ultrasonidos en los lodos también se pone de manifiesto en el aumento que tiene la DQO soluble en ambos extractos.

Por lo demás, se confirma con la Tabla 4.14, que ambos extractos aportarán a los sistemas de lodos activos una mayor actividad enzimática y DQO. En ambos extractos, la actividad enzimática extracelular es parecida si ésta se expresa por unidad de sólido volátil en suspensión. Si expresáramos la actividad enzimática por unidad de volumen (Tabla 4.15) que es, a efectos prácticos, la magnitud que se maneja para la adición de los extractos a los sistemas, obtendríamos que la actividad celular aportada por unidad de volumen de extracto es superior en el AUC.

Tabla 4.15.- Actividad extracelular en extracto AUC y ANUC por unidad volumétrica.

	Extracto AUC	Extracto ANUC
Proteasa, $\mu\text{molesAzocaseína}/(\text{min}\cdot\text{l})$	6.76	2.69
α -Glucosidasa, $\mu\text{moles p-nitrofenil-}\alpha\text{-d-glucopiranosido}/(\text{min}\cdot\text{l})$	47,25	23,54
Esterasa, $\mu\text{molesFDA}/(\text{min}\cdot\text{l})$	42,28	17,94

En base a los resultados de la caracterización (Tabla 4.14) se puede concluir que la ultrasonicación de los lodos produce un incremento notable en la actividad enzimática presente en el licor mezcla. De esta forma, con la adición de los extractos se está aportando mayor cantidad de enzimas extracelulares al sistema de lodos activos lo cual va a favorecer la solubilización del fango y la materia orgánica particulada y coloidal.

Una vez presentados los datos de la caracterización de los extractos que se adicionaron sobre los reactores de lodos activos, se presentan a continuación los resultados del seguimiento de dichos reactores.

En la Tabla 4.16 se muestran los valores de sólidos en suspensión distinguiéndose la fracción volátil de los mismos.

Tabla 4.16.- Sólidos en suspensión en los reactores empleados en el ensayo.

Sólidos en suspensión	STS, g/L			SVS, g/L		
	Blanco	10% AUC ¹	10% ANUC ²	Blanco	10% AUC ¹	10% ANUC ²
Inicial	4,16	4,55 _(0.061)	4,59 _(0.087)	3,20	3,43 _(0.060)	3,49 _(0.038)
0 horas	4,38	4,72 _(0.027)	4,76 _(0.091)	3,37	3,69 _(0.084)	3,75 _(0.092)
2 horas	4,57	4,84 _(0.084)	5,03 _(0.034)	3,48	3,76 _(0.039)	3,88 _(0.040)
5 horas	4,60	4,92 _(0.067)	5,03 _(0.061)	3,52	3,80 _(0.018)	3,90 _(0.031)
24 horas	4,62	4,97 _(0.004)	5,06 _(0.049)	3,54	3,81 _(0.057)	3,92 _(0.051)

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5 Entre paréntesis, SD

En los cinco reactores que se mantuvieron en la realización de este ensayo se determinó un incremento en la variable sólidos en suspensión así como en la fracción volátil. En concreto el aumento en la concentración de los sólidos volátiles en suspensión fue de 5,04% para el reactor de referencia, de 3,25 % en los reactores con un 10% de AUC y de un 4,63% en los sistemas con un 10% de ANUC. No obstante, el parámetro apropiado para comprobar si los extractos han conseguido disminuir la producción de fangos en el sistema de lodos activos, es el de Y_{OBS} que se muestra más adelante, dónde se relaciona la variación de la biomasa (la generación neta de la misma) con la reducción de la materia orgánica presente inicialmente en el medio.

En la Tabla 4.17 se muestran las concentraciones de materia orgánica soluble presentes en los reactores así como la tasa específica de respiración que mostraron los microorganismos a lo largo del ensayo.

Tabla 4.17 .- Evolución de la Demanda Química de Oxígeno y de la tasa específica de respiración a lo largo del ensayo.

	DQO, mgO ₂ /L			SOUR, mgO ₂ /(d SVS·d)		
	Blanco	10% AUC ¹	10% ANUC ²	Blanco	10% AUC ¹	10% ANUC ²
Inicial	81,68	575,71 _(6,17)	880,10 _(3,77)	90,28	216,09 _(1,25)	637,53 _(6,11)
0 horas	508,30	1189,50 _(5,78)	1265,70 _(11,26)	399,20	517,60 _(6,48)	751,60 _(16,25)
2 horas	327,37	628,51 _(4,26)	638,63 _(10,24)	203,23	256,69 _(3,57)	440,00 _(3,24)
5 horas	236,66	462,86 _(3,69)	473,79 _(4,57)	159,70	223,78 _(0,39)	341,57 _(1,28)
24 horas	145,99	317,08 _(1,22)	317,96 _(2,16)	130,19	199,23 _(2,72)	203,47 _(6,29)

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5 Entre paréntesis, SD

El valor de la tasa específica de respiración (SOUR) aumenta tras la adición del agua residual sintética especialmente en el reactor de referencia (de 90 a 400 mgO₂/l) y en el reactor en el que se adicionó extracto AUC (de 215 a 515 mgO₂/l). En los reactores con extracto procedente del lodo anaerobio (ANUC), la actividad únicamente crece de forma leve, de 635 a 750 mgO₂/l. Como ocurría en el caso anterior, la biomasa presente en el sistema con ANUC presenta una actividad elevada desde el inicio debido a que la DQO aportada sigue siendo alta en comparación con la del AUC y la del lodo aerobio (Tabla 4.14). Esta elevada concentración de materia orgánica degradable, produce la activación de la biomasa presente en el sistema la cual ha permanecido en aireación durante 24 horas sin la adición de sustrato. Por otra parte, tal y como se deduce de la Tabla 4.14, el extracto ANUC presenta una mayor actividad DHA y, por lo tanto, su adición al reactor de lodos activos puede incrementar la tasa global de consumo de oxígeno. El AUC no aporta una DQO tan alta como el ANUC y el ANC (Tabla 4.8). En este ensayo el sistema con ANUC tiene una DQO en el tiempo inicial de 880 mgO₂/l mientras que en los reactores con AUC se sitúa en torno a 575 mgO₂/l. Al añadir la ARS, la DQO aumenta un 50% en el sistema con ANUC, al doble en la cuba con AUC y cinco veces (de 80 a 510 mgO₂/l) en el reactor de referencia. Tras el aumento inicial que experimenta el SOUR por la adición del ARS, se verifica un descenso de la tasa específica de respiración, teniendo al final del periodo los dos reactores a los que se añadió el extracto un SOUR similar. En el reactor blanco, la actividad de la biomasa es algo menor, 130 frente a los 200 mgO₂/(g SVS•d) de los sistemas con extractos. Este hecho se puede atribuir a que en estos sistemas, la cantidad de materia orgánica degradable en el licor mezcla es superior a la que se encuentra en el reactor de referencia, siendo necesario un mayor y más prologado consumo de oxígeno para su degradación.

El hecho de que el extracto ANUC aporte en el tiempo inicial una DQO más baja que en el caso anterior puede ser debido a las fluctuaciones que se dan en los regímenes de operatividad del digestor del que se extrae el lodo anaerobio.

A continuación se muestra la tasa porcentual de reducción de la DQO en los diferentes sistemas (Tabla 4.18).

Tabla 4.18.- Porcentajes de eliminación de la DQO

Reducción	Blanco	10% AUC	10% ANUC
DQO, %	71,28	73,34	74,88

La reducción es algo mayor en los sistemas con adición de extracto. El rendimiento registra el mejor rendimiento en el reactor al que se adicionó extracto ANUC

Por último, en la siguiente tabla se muestra la tasa de crecimiento, Y_{OBS} , de los diferentes reactores.

Tabla 4.19.- Tasa de crecimiento en los reactores a lo largo del ensayo

	SVS ₂₄ -SVS ₀ , mg/L	DQO _{24h} -DQO ₀ , mgO ₂ /L	Y _{OBS} , mgSVS/mgDQO
Blanco	170	362,31	0,47
10% AUC ¹	120	872,42	0,14
10% ANUC ²	170	947,74	0,18

1.- Valor promedio Reactor 2 y 3 ; 2.- Valor promedio Reactor 4 y 5

La tasa de crecimiento es notablemente menor en los sistemas dónde se ha añadido extracto de lodos centrifugado. Se comprende de manera sencilla la influencia de la adición de los extractos observando la reducción neta de DQO registrada en el reactor de referencia y en el sistema con ANUC: en el primero, la reducción es de 360 mgO₂/l mientras que en el segundo es de 950 mgO₂/l. Sin embargo, en ambos sistemas se registra un mismo crecimiento de biomasa (170 mgSVS/L). Entre los sistemas con adición de extractos la Y_{OBS} no difiere casi (0,14-0,18 mg SVS/mg DQO).

Conclusión.

Mientras que el AUC aportaba una mayor actividad enzimática extracelular según se vio en las ilustraciones correspondientes al ensayo de actividad (Tabla 4.14), el ANUC aumentaba más la DQO del reactor al que se añadía (6 veces la aumentaba el AUC, 10 veces el ANUC) y tenía una biomasa propia más activa que la del AUC, como se puede también observar en la misma tabla referida. El mayor SOUR del sistema con ANUC y la mayor concentración en sólidos en el mismo, hace que el consumo final de oxígeno y

su demanda sea mayor que en el reactor al que se añade el AUC, siendo éste un interesante aspecto a tener en cuenta en el estudio de viabilidad técnica y económica de la estrategia propuesta.

En cuanto a la tasa de reducción de DQO, se puede afirmar que la adición de ambos extractos no compromete la finalidad última de la instalación (degradación de la materia orgánica), siendo similares los valores registrados en los 2 reactores con extractos y el de referencia.

Por todo lo comentado anteriormente, el empleo de AUC puede considerarse una buena alternativa al uso de ANUC, principalmente en aquellos casos en los que no sea viable disponer de un reactor anaerobio de lodos.

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de los ensayos realizados, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- El hecho de que la naturaleza de los lodos empleados sea variable, hace que los resultados obtenidos en este trabajo deban considerarse tendenciales y, en ningún caso, taxativos.
- Las tasas de crecimiento obtenidas en los reactores a los que se les ha añadido lodo, tanto sin tratar como tratado, han sido menores que las que se han obtenido en los reactores de referencia, lo que pone de manifiesto la influencia de estos materiales biológicos sobre la producción de biomasa en un sistema de lodos activos.
- Las tasas de crecimiento, Y_{obs} , de los reactores a los que se añade lodo digerido, tanto sin tratar como tratado, son más bajas que la correspondiente al sistema de referencia y, por tanto, se puede concluir que producen un descenso en la producción de biomasa en el sistema de depuración de lodos activos.
- El sistema al que se añade el lodo anaerobio sin tratar, y en menor medida, a los que se añade el extracto del lodo ultrasonicado y centrifugado presentan una elevada tasa específica de respiración. El hecho de que además tengan un alto contenido en sólidos volátiles en suspensión hace que la demanda de oxígeno por parte de estos sistemas sea tan elevada que pueden ser económicamente inviables para su aplicación a escala real.
- Los lodos sin tratar poseen una alta actividad enzimática medida por unidad de volumen y una biomasa más activa que los lodos tratados, pero la presencia de aglomerados de sólidos en el sistema dificultan la acción de las enzimas, siendo más eficaces éstas en los reactores donde se añadieron extractos del lodo procesado.
- Es recomendable expresar las unidades de actividad enzimática en base volumétrica, ya que de esta forma, se dará un dato más práctico a la hora de estimar la actividad presente en un medio y la repercusión que puede tener su adición en un determinado sistema.
- A medida que el proceso de depuración se extiende, el metabolismo de la biomasa presente se aproxima al crecimiento endógeno (baja carga orgánica, aireación prolongada).. Es por ello que la tasa de crecimiento global, va siendo, también, menor.

Es de destacar, a raíz de los resultados de este estudio que esta tendencia es más notable en los sistemas con adición de extractos.

- El rendimiento del proceso de depuración del sistema de lodos activos no se ve afectado por la adición de los diferentes materiales biológicos empleados en la realización de los ensayos recogidos en la presente memoria.
- Aunque el extracto ANUC proporciona una tasa de crecimiento menor, los inconvenientes derivados del alto contenido en sólidos en suspensión propician que el extracto más recomendable a emplear en futuros estudios sea el del lodo aerobio tras ser ultrasonicado y centrifugado (AUC). Esto es debido sobre todo a criterios de índole económica: Los requisitos de aireación que requiere el sistema ANUC, dónde se registra un alto contenido en SVS y una alta tasa específica de respiración, son bastante más altos que en un sistema con extracto de la ultrasonicación del lodo de digestión aerobia. Por otra parte, cuando se añade al sistema de lodos activos el extracto procedente del lodo de digestión anaerobia, la DQO soluble de la unidad aumenta mucho, lo que supone una pérdida en el rendimiento global de la instalación, puesto que ahora hay que eliminar tanto la carga orgánica entrante con el influente como la que supone la adición del extracto.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. American Public Health Association (APHA) (1992) “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater”. 18th Edition. Greenberg et al., eds.
2. Aragón, C., Quiroga, J.M. & Coello, M.D., 2009. Comparison of four chemical uncouplers for excess sludge reduction. *Environmental Technology*, 30(7), págs.707-714.
3. Aragón Cruz, CA (2009). “Optimización del proceso de lodos activos para reducir la generación de fangos residuales” Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
4. Awong, J., Bitton, G. & Koopman, B., 1985. ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. *Water Research*, 19(7), págs.917-921.
5. Barragán Sánchez, J (2004). “Criterios para el establecimiento de índices de estabilización en biosólidos: aplicación a variantes del proceso de digestión aerobia”. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
6. Benthin, S., Nielsen, J. & Villadsen, J., 1991. A simple and reliable method for the determination of cellular RNA content. *Biotechnology Techniques*, 5(1), págs.39-42.
7. Burgess, J.E. & Pletschke, B.I., 2008. Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini-review. *Water SA*, 34(3), págs.343-349.
8. Cadoret, A., Conrad, A. & Block, J.-C., 2002. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1-2), págs.179-186.
9. Chen, G.-H., Saby, S., Djafer, M. & Mo, H.-K., 2001b. *New approaches to minimize excess sludge in activated sludge systems*,
10. Chu, L. et al., 2009. Progress and perspectives of sludge ozonation as a powerful pretreatment method for minimization of excess sludge production. *Water Research*, 43(7), págs.1811-1822.
11. Ding, W.-C. et al., 2006. Enhancing excess sludge aerobic digestion with low intensity ultrasound. *Journal of Central South University of Technology (English Edition)*, 13(4), págs.408-411.
12. Fontvieille, D.A., Outaguerouine, A. & Thevenot, D.R., 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. *Environmental Technology*, 13(6), págs.531-540.

13. Frolund, B., Griebe, T. & Nielsen, P.H., 1995. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), págs.755-761.
14. Goel, R. et al., 1998. Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Water Research*, 32(7), págs.2081-2088.
15. Guellil, A. et al., 2001. *Hydrolysis of wastewater colloidal organic matter by extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs*, Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035009878&partnerID=40&md5=01a638ecb593a732b317819867f69425>.
16. He, J. et al., 2011. Ultrasonic reduction of excess sludge from activated sludge system: Energy efficiency improvement via operation optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), págs.99-103.
17. Hendrickx, T.L.G. et al., 2010. Aquatic worms eat sludge: Mass balances and processing of worm faeces. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), págs.633-638.
18. Hernández Muñoz, Aurelio (2001) *Depuración y desinfección de Aguas Residuales (5ª Edición)*. Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Colección Senior nº 9.
19. Horan NJ. (1999), "Biological Wastewater Treatment Systems". Chichester, UK: Wiley.
20. Jung, S.-J. et al., 2006. Effect of intermittent aeration on the decrease of biological sludge amount. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), págs.246-251.
21. Khursheed, A. & Kazmi, A.A., 2011. Retrospective of ecological approaches to excess sludge reduction. *Water Research*, 45(15), págs.4287-4310.
22. Liu, Y. & Fang, H.H.P., 2003. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 33(3), págs.237-273.
23. Liwarska-Bizukojc, E. & Ledakowicz, S., 2003. Estimation of viable biomass in aerobic biodegradation processes of organic fraction of municipal solid waste (MSW). *Journal of Biotechnology*, 101(2), págs.165-172.
24. Liwarska-Bizukojc, E. & Ledakowicz, S., 2001. RNA assay as a method of viable biomass determination in the organic fraction of municipal solid waste suspension. *Biotechnology Letters*, 23(13), págs.1057-1060.
25. Lopez, J.M., Koopman, Ben & Bitton, Gabriel, 1986. Int-dehydrogenase test for activated sludge process control.. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(7), págs.1080-1085.
26. Low, E.W. & Chase, H.A., 1998. The use of chemical uncouplers for reducing

- biomass production during biodegradation. *Water Science and Technology*, 37(4-5), págs.399-402
27. Mason, C.A., Hamer, G. & Bryers, J.D., 1986. The death and lysis of microorganisms in environmental processes. *FEMS Microbiology Letters*, 39(4), págs.373-401.
 28. Martinage, V. & Paul, E., 2000. Effect of environmental parameters on autotrophic decay rate (b(A)). *Environmental Technology*, 21(1), págs.31-41
 29. Maurines-Carboneill, C. et al., 1998. Relevance of the INT test response as an indicator of ETS activity in monitoring heterotrophic aerobic bacterial populations in activated sludges. *Water Research*, 32(4), págs.1213-1221.
 30. Metcalf and Eddy, Inc. Wastewater Engineering Treatment, Disposal and Reuse 4th edition, McGraw-Hill. Inc, 2003
 31. Ødegaard, H., 2004. *Sludge minimization technologies - An overview*,
 32. Parmar, N., Singh, A., Ward, O.P., 2001. Enzyme treatment to reduce solids and improve settling of sewage sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 383-386.
 33. Pazoki, M., Takdastan, A. & Jaafarzadeh, N., 2010. Investigation of minimization of excess sludge production in sequencing batch reactor by heating some sludge. *Asian Journal of Chemistry*, 22(3), págs.1751-1759
 34. Pérez-Elvira, S.I., Nieto Diez, P. & Fdz-Polanco, F., 2006. Sludge minimisation technologies. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5(4), págs.375-398.
 35. Ramalho R.S. (1996). "Tratamiento de las aguas residuales" Editorial Reverté.
 36. Ratsak, C.H., Kooi, B.W. & van Verseveld, H.W., 1994. Biomass reduction and mineralization increase due to the ciliate *Tetrahymena pyriformis* grazing on the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Water Science and Technology*, 29(7), págs.119-128
 37. Tiehm, A. et al., 2001. Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research*, 35(8), págs.2003-2009.
 38. Tokumura, M. et al., 2009. Solubilization of excess sludge in activated sludge process using the solar photo-Fenton reaction. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2-3), págs.1390-1396
 39. Werther, J. & Ogada, T., 1999. Sewage sludge combustion. *Progress in Energy and Combustion Science*, 25(1), págs.55-116
 40. Yan, Y. et al., 2010. Effect of ultrasonic specific energy on waste activated sludge solubilization and enzyme activity. *African Journal of Biotechnology*, 9(12), págs.1776-1782.

41. Ye, F. & Li, Y., 2010. Oxic-settling-anoxic (OSA) process combined with 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide (TCS) to reduce excess sludge production in the activated sludge system. *Biochemical Engineering Journal*, 49(2), págs.229-234
42. Yu, G.-H. et al., 2008. Extracellular proteins, polysaccharides and enzymes impact on sludge aerobic digestion after ultrasonic pretreatment. *Water Research*, 42(8-9), págs.1925-1934.
43. Zhao, Q. & Kugel, G., 1996. Thermophilic/mesophilic digestion of sewage sludge and organic wastes. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 31(9), págs.2211-2231.

Legislación:

1. BOE (1985) OM de 5 de Septiembre de 1985. Biodegradabilidad de los detergentes.
2. Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas
3. Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas.
4. (HSWA) The Hazardous and Solid Waste Amendments of 1984 (P.L. 98-616, 98 Stat. 3221)
5. Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura
6. Resource Conservation and Recovery Act (RCRA of 1976), (1984) 2USCx6901, 98e616, N.

