

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

MASTER OFICIAL EN SEGURIDAD INDUSTRIAL Y MEDIO AMBIENTE



**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL
LICOR DE MEZCLA EN
BIORREACTORES DE MEMBRANA Y SU
CORRELACIÓN CON LAS
RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN**

TESIS DE MASTER

AUTOR:

Elena Zuriaga Agustí

DIRECTORES:

Dra. Dña. Amparo Bes Piá

Dr. D. José Antonio Mendoza Roca

Valencia, Octubre 2010

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	1
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	1
1.2. PROCESO DE FANGOS ACTIVOS.....	3
1.2.1. Depuración biológica de las aguas residuales.....	3
1.2.2. Fundamentos del proceso convencional de fangos activos.....	4
1.2.2.1. Los procesos de oxidación biológica.....	4
1.2.2.2. Factores que intervienen en la oxidación biológica.....	5
1.2.2.3. Los procesos de Nitrificación-Desnitrificación.....	7
1.2.2.4. Clasificación de los microorganismos.....	8
1.3. LA ULTRAFILTRACIÓN Y MICROFILTRACIÓN.....	10
1.3.1. Materiales de membrana.....	11
1.3.2. Caracterización de las membranas de UF/MF.....	12
1.3.3. Ensuciamiento de la membrana.....	13
1.3.4. Polarización por concentración.....	15
1.4. BIORREACTORES DE MEMBRANA.....	17
1.4.1. Fundamentos.....	17
1.4.2. Evolución histórica.....	18
1.4.3. El mercado actual de los BRM.....	20
1.4.4. Configuraciones de los BRM.....	21
1.4.5. Limpieza de las membranas.....	24
1.4.6. Ventajas e inconvenientes de los BRM.....	25
1.4.7. Configuración de las membranas empleadas en BRM.....	27
1.4.8. Parámetros de diseño de un BRM.....	31
1.4.8.1. Edad del fango.....	32
1.4.8.2. Carga másica.....	33
1.4.8.3. Tiempo de retención hidráulico.....	33
1.4.8.4. Carga volumétrica.....	34
1.4.9. Formas de operación de un BRM.....	34
1.4.9.1. Flux de operación.....	34
1.4.9.2. Aireación.....	35

1.4.9.3. Estrategias de operación.....	36
1.4.10. Modelo de las resistencias a la filtración en BRM.....	37
1.5. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL LICOR MEZCLA EN LA OPERACIÓN DE LOS BRM.....	39
2. OBJETIVO.....	43
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
3.1. Toma de muestras y conservación.....	45
3.2. Análisis previos del licor de mezcla.....	46
3.2.1. SSLM y SSVLM.....	46
3.2.2. Sedimentabilidad del fango (V_{30}).....	49
3.2.3. Tiempo de succión capilar (TSC).....	49
3.2.4. Análisis al microscopio óptico.....	51
3.3. Procesos de extracción de EPS.....	52
3.3.1. Introducción.....	52
3.3.2. Procedimientos.....	55
3.4. Caracterización química del licor de mezcla.....	65
3.4.1. Método de adición estándar.....	65
3.4.2. Análisis de proteínas.....	63
3.4.3. Análisis de carbohidratos.....	76
3.4.4. Análisis de ADN.....	83
3.5. Ensayo de las resistencias a la filtración.....	85
3.5.1. Módulo de membranas.....	85
3.5.2. Procedimiento experimental.....	85
3.5.3. La membrana.....	89
4. RESULTADOS.....	93
4.1. Ensayos preliminares.....	93
4.1.1. Toma de muestra y conservación.....	93
4.1.2. Selección de métodos analíticos.....	94
4.1.3. Selección de métodos de extracción.....	96

4.1.4. Comparación entre convencional y BRM.....	99
4.2. Caracterización química.....	100
4.3. Resistencias a la filtración y TSC	
4.4. Correlación entre las EPS, SMP, resistencias a la filtración y TSC.....	107
4.4.1. Influencia de las EPS en las resistencias a la filtración.....	107
4.4.2. Influencia de los SMP en las resistencias a la filtración.....	110
4.4.3. Influencia de las SSLM y SSVLM en las resistencias a la filtración...	113
4.4.4. Influencia del TSC en las resistencias a la filtración.....	114
4.5. Microscopio SEM y AFM.....	116
4.6. Microscopio óptico.....	118
4.7. Análisis de la sedimentabilidad del fango (V_{30}).....	120
5. CONCLUSIONES.....	121
6. BIBLIOGRAFÍA.....	123
7. ANEXO.....	125

1. ANTECEDENTES

1.1 JUSTIFICACIÓN

Los biorreactores de membrana (BRM) (reactor biológico + MF/UF) se incluyen en las denominadas tecnologías de membrana, las cuales han experimentado un gran desarrollo en la última década. La aplicación de estas tecnologías a los BRM permite la separación del licor de mezcla (fango) y el agua depurada mediante membranas, obteniendo ventajas importantes frente a los procesos convencionales de depuración de aguas residuales, tales como mayor calidad del agua tratada, posibilidad de operar con altas concentraciones de biomasa, baja producción de fangos, (inhibición del crecimiento de bacterias filamentosas que tampoco serían un problema ya que no hay etapa de decantación) y tamaño compacto de la planta.

El aumento de la demanda de agua unido a la escasez de la misma, ha impulsado la implantación de estos sistemas, empleándose tanto para aguas residuales industriales como para aguas urbanas, especialmente en aquellos casos en que se plantea la posibilidad de reutilización de agua.

El principal inconveniente de los BRM es el ensuciamiento o *fouling* de las membranas, que produce la disminución del flujo de permeado, el aumento de la presión transmembranal de operación e implica la realización de ciclos de limpieza para restaurar el sistema, todo ello traduciéndose en un aumento de los costes de operación.

En el BRM, al ser un sistema biológico de tratamiento del agua residual, los elementos que suelen producir el ensuciamiento son principalmente materiales coloidales o sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que son metabolitos excretados por la biomasa.

Es por ello que el fin de la presente tesis de máster es estudiar las características del licor de mezcla sobre el ensuciamiento de las membranas a través del análisis de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y su influencia en las resistencias a la filtración. Hoy en día no existe ningún protocolo normalizado para la cuantificación de las EPS por lo que se han utilizado diferentes métodos de extracción y de análisis de las mismas y así poder establecer un protocolo de caracterización del licor de mezcla de un BRM que permita conocer las características químicas del mismo.

1.2 PROCESO DE FANGOS ACTIVOS

1.2.1 DEPURACIÓN BIOLÓGICA DE LAS AGUAS RESIDUALES

Los procesos biológicos se basan en la utilización de microorganismos capaces de asimilar las sustancias en suspensión o disueltas presentes en el agua residual, a fin de incorporarlas al metabolismo celular y de obtener energía para sus funciones vitales y promover el desarrollo somático.

Teniendo un control adecuado de las condiciones ambientales (pH, temperatura, O₂...) es posible conseguir el desarrollo de una biomasa capaz de depurar el agua residual hasta alcanzar el grado de depuración deseado.

Cuando las aguas residuales entran en una estación depuradora, se someten a un pretratamiento en el que se retiran los sólidos y gruesos de gran tamaño, así como las arenas y grasas. A continuación, el agua pasa al denominado tratamiento primario, donde se eliminan sólidos en suspensión fácilmente sedimentables y algo de materia orgánica.

La materia orgánica que queda disuelta y en suspensión así como el resto de las partículas sólidas que no se han eliminado en los tratamientos anteriores, son eliminadas mediante los denominados procesos biológicos de depuración. Estos pueden ser aerobios o anaerobios si interviene o no el oxígeno. En la línea de aguas constituyen los denominados tratamientos secundarios.

Estos procesos se pueden definir como aquellos realizados por un determinado grupo de microorganismos (principalmente bacterias y protozoos), que en presencia de oxígeno, actúan sobre la materia orgánica disuelta, suspendida y coloidal existente en el agua residual, transformándola en gases y material celular, que puede separarse fácilmente mediante sedimentación. La unión de materia orgánica, bacterias y sustancias minerales forma los flóculos y el conjunto de flóculos es lo que todos conocemos como fango biológico.

En el caso de algunas aguas residuales urbanas, también se persigue la eliminación de nitrógeno y de fósforo. Por último, conseguimos además la disminución de los microorganismos patógenos y fecales que habitan el agua residual.

Básicamente, existen dos tipos de tratamientos biológicos aerobios:

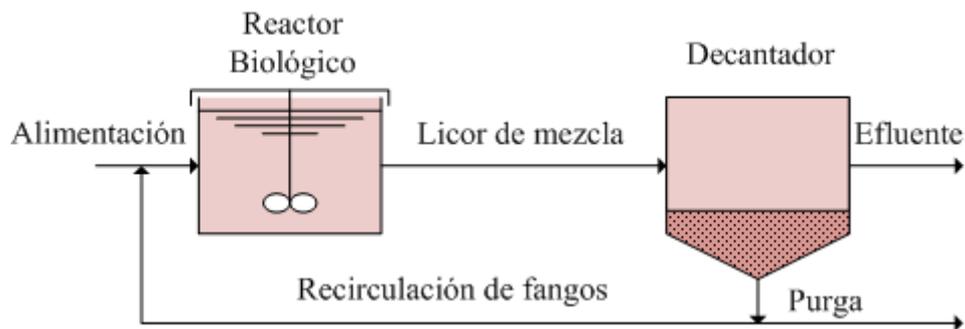
- ✓ **Fangos Activados:** es un sistema de tratamiento de las aguas residuales en el que se mantiene un cultivo biológico en suspensión formado por diversos tipos de microorganismos y el agua residual a tratar. Los microorganismos convierten la materia orgánica y los nutrientes en compuestos más simples como dióxido de carbono y agua, así como en nueva biomasa. Durante el proceso se forman

agregados de partículas fácilmente decantables que se denominan flóculos y que en conjunto constituyen los denominados fangos activos o biológicos.

- ✓ **Lechos Bacterianos:** es un sistema biológico aerobio en el cual el cultivo biológico está fijado a un medio soporte o relleno. El agua residual discurre transversalmente sin llegar a inundarlo y permite que en los huecos del relleno haya el aire suficiente para la oxigenación de la biopelícula desarrollada.

El proceso más común para el tratamiento biológico del agua residual es el sistema de fangos activos, cuyo esquema de proceso puede verse en la figura 1.1.

Figura 1.1: Esquema de un proceso de fangos activos



El reactor biológico aireado recibe el influente, oxida la materia orgánica y a continuación pasa al decantador donde se separa la biomasa del agua tratada. Para mantener la concentración de biomasa dentro del reactor biológico se recircula una parte del fango separado en el decantador y el resto de fango se purga para evitar el aumento y envejecimiento excesivo de la biomasa. Este sistema de fangos activos fue puesto en funcionamiento por primera vez por Ardem y Lockett en 1914, en Inglaterra.

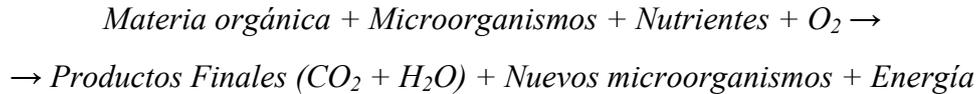
1.2.2 FUNDAMENTOS DEL PROCESO CONVENCIONAL DE FANGOS ACTIVOS

1.2.2.1 Los procesos de oxidación biológica

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la oxidación biológica es el mecanismo mediante el cual los microorganismos degradan la materia orgánica contenida en el agua residual. Los microorganismos necesitan para la realización de sus funciones vitales:

- Una fuente de energía para desarrollar sus actividades
- Una fuente de carbono para realizar la síntesis celular
- Una fuente de oxígeno y nutrientes necesarios para la vida

De esta forma, estos microorganismos se alimentan de dicha materia orgánica en presencia de oxígeno y nutrientes, de acuerdo con la siguiente reacción:

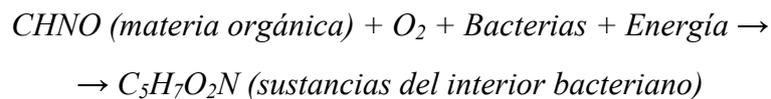


Para que se lleve a cabo, son necesarias dos tipos de reacciones fundamentales:

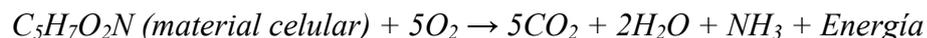
✓ **Reacciones de síntesis o asimilación:** Consisten en la incorporación del alimento (materia orgánica y nutrientes) al interior de los microorganismos. Estos microorganismos al obtener suficiente alimento no engordan, sino que forman nuevos microorganismos reproduciéndose rápidamente.

Las reacciones de síntesis son reacciones endotérmicas, es decir, consumen energía. En ellas tienen un papel muy importante las enzimas (biocatalizadores proteicos), que actúan aumentando la velocidad de las reacciones.

Parte del alimento es utilizado como fuente de energía. La reacción que ocurre es la siguiente:



✓ **Reacciones de oxidación y respiración endógena:** Los microorganismos necesitan energía para poder realizar sus funciones vitales (moverse, alimentarse, etc.). Dicha energía la obtienen transformando la materia orgánica tanto asimilada como acumulada en forma de sustancias de reserva, en gases, agua y nuevos productos de acuerdo con la siguiente reacción:



Las reacciones de oxidación son exotérmicas, es decir, producen energía. Consisten en la oxidación de la materia orgánica y la autocombustión del protoplasma celular.

A todo este conjunto de reacciones se les denomina de oxidación biológica, porque los microorganismos necesitan de oxígeno para realizarlas.

1.2.2.2 Factores que intervienen en la oxidación biológica

La complejidad de las reacciones de oxidación biológica de la materia orgánica hace que éstas se puedan ver favorecidas o inhibidas por muchos agentes externos.

Los factores principales que hay que tener en cuenta para que se produzcan las reacciones biológicas y por tanto, la depuración del agua residual son:

- Características del sustrato: las características físico-químicas del agua residual, determinan el mejor o peor desarrollo de los microorganismos en este sistema, existiendo compuestos contaminantes que son degradables biológicamente y otros que no lo son. La biodegradabilidad del alimento es lo que condiciona el rendimiento del tratamiento.

En la tabla 1.1 se relacionan una serie de sustancias que se pueden encontrar en las aguas residuales y su grado de degradabilidad biológica.

Tabla 1.1: Degradabilidad biológica de sustancias presentes en las aguas residuales

Sustancias	Degradabilidad biológica
Carbohidratos	Fáciles
Alcanos	Difíciles
Olefinas	Difíciles
Hidrocarburos saturados y clorados	Nulos
Cloro-olefinas	Nulos
Azúcares	Fáciles
Alcoholes 1° y 2°	Fáciles
Alcoholes 3°	Difíciles
Ácidos	Fáciles
Fenoles	Fáciles
Clorofenoles	Nulos
Aminas-Amidas	Fáciles
Éteres	Difíciles o Nulos

- Nutrientes: el interior celular, aparte de C, H y O, elementos característicos de la materia orgánica, contiene otros elementos como son el N, P, S, Ca, Mg etc., denominados nutrientes. A pesar de que muchos de ellos se encuentran en el organismo sólo en pequeñas cantidades, son fundamentales para el desarrollo de la síntesis biológica.

Los microorganismos para sobrevivir necesitan por cada 1000 gr. de C, 43 de N y 6 de P y en las aguas residuales urbanas existen por cada 1000 gr. de C, 200 gr. de N y 16 gr. de P, luego los microorganismos pueden desarrollarse en el agua residual perfectamente.

En el caso de determinadas aguas con vertidos industriales, las proporciones de dichos elementos no están equilibradas, siendo necesario a veces dosificar N y P en el agua, para que pueda darse el desarrollo bacteriano y exista depuración biológica.

- Aporte de oxígeno: para el desarrollo de las reacciones biológicas es necesario un medio aerobio, es decir, oxígeno suficiente que permita el desarrollo y la respiración de los microorganismos aerobios.
- Temperatura: a medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad con que los microorganismos degradan la materia orgánica.
- pH: El pH tiene una doble influencia en las reacciones biológicas de oxidación, por un lado puede inhibir el desarrollo de los microorganismos a pH mayores de 9,5 o inferiores a 5 y, por otro lado, tiene un efecto sobre la velocidad de las reacciones.
- Salinidad: el contenido en sales disueltas no suele ser problemático para el desarrollo bacteriano. Con un periodo de adaptación adecuado existen multitud de grupos bacterianos capaces de vivir en aguas saladas.
- Tóxicos o inhibidores: existen una serie de sustancias orgánicas e inorgánicas que, a ciertas concentraciones, inhiben o impiden los procesos biológicos. Este tipo de sustancias, entre las que se encuentran los metales pesados, ejercen un efecto perjudicial sobre los microorganismos encargados de depurar el agua y por tanto, no deben de entrar en las plantas depuradoras con el agua residual, o si entran deben de hacerlo en concentraciones muy bajas.

1.2.2.3 Los procesos de Nitrificación-Desnitrificación

Son procesos llevados a cabo por determinados grupos de microorganismos bacterianos que se utilizan en aquellas plantas de tratamiento de aguas residuales, donde aparte de la eliminación de la materia orgánica se persigue la eliminación de nitrógeno.

✓ **El proceso de Nitrificación**: es el proceso en el que el nitrógeno orgánico y amoniacal se oxida, transformándose primero en nitrito y, posteriormente en nitrato. Estas reacciones las llevan a cabo bacterias nitrificantes, muy especializadas, diferentes de aquellas que se encargan de degradar la materia orgánica del medio. Este tipo de bacterias, se reproducen más lentamente y son muy sensibles a los cambios de su medio habitual. A su vez, necesitan de un aporte de oxígeno suplementario para que sean capaces de desarrollar las reacciones anteriormente mencionadas, de esta forma en las cubas de aireación de fangos activados necesitan una concentración de oxígeno de al menos 2 mg/l.

✓ **El proceso de Desnitrificación**: La desnitrificación consiste en el paso de los nitratos a nitrógeno atmosférico, por la acción de un grupo de bacterias llamadas desnitrificantes. Dicha forma de nitrógeno tenderá a salir a la atmósfera, consiguiéndose así la eliminación de nitrógeno en el agua. Para que las bacterias desnitrificantes actúen, es necesario que el agua tenga bastante carga de materia orgánica, una fuente de nitratos elevada, no tenga oxígeno molecular y posea un pH situado entre 7 y 8. El oxígeno

asociado a los nitratos es la única fuente de oxígeno necesaria para llevar a cabo sus funciones vitales. De esta forma los niveles de oxígeno libre en el medio donde actúan deben de ser inferiores a los 0,2 mg/l, es lo que se conoce como condiciones anóxicas.

1.2.2.4 Clasificación de los microorganismos

Son numerosos los criterios que permiten establecer una clasificación de los microorganismos que intervienen en la depuración del agua. En este apartado se resumen los métodos de clasificación más comunes.

La clasificación más general se establece en función del **nivel de desarrollo**. Este criterio divide a los microorganismos en procariotas y eucariotas:

- Los organismos procariotas, son los menos desarrollados. La célula procariota es muy sencilla y se caracteriza por carecer de membrana nuclear, por lo que el núcleo es difuso y el material genético se encuentra libre en el citoplasma. Se trata de células más pequeñas, con un grado de complejidad estructural menor que las eucariotas, y tan sólo constituyen organismos unicelulares, como las bacterias.
- Los organismos eucariotas son más evolucionados y presentan un grado de complejidad superior. Se caracterizan por poseer verdaderos órganos protegidos por una membrana nuclear. La célula eucariota alcanza mayores niveles de organización al poder construir organismos unicelulares o pluricelulares. Son eucariotas los protistas, los hongos, las plantas y los animales.

Según la **naturaleza de las reacciones catabólicas** con las que se sustentan, se pueden clasificar en:

- Autótrofos: Son aquellos capaces de sintetizar su alimento sin fuente orgánica de carbono. Para ello requieren agua, CO₂, sales minerales y energía. Dependiendo de cuál sea su fuente de energía se puede hablar de:
 - *Fotosintéticos*, si la obtienen de la luz solar.
 - *Quimiosintéticos*, si la obtienen por oxidación de materia inorgánica.
- Heterótrofos: Son aquellos que requieren una fuente orgánica de carbono para su desarrollo. Estos a su vez se subdividen en:
 - *Holozoicos*: Aquellos que presentan un aparato digestivo completo.
 - *Saprófitos*: Aquellos que absorben la materia orgánica directamente por su membrana celular. La mayoría de los microorganismos responsables de la depuración de las aguas son de este tipo.
 - *Parásitos*: Su nutrición depende de otro ser vivo.

Otro criterio de clasificación de los microorganismos se basa en su **relación con el oxígeno molecular**. De esta forma se tiene:

- Microorganismos aerobios: aquellos que utilizan el oxígeno atmosférico en la respiración.
- Microorganismos anaerobios: se desarrollan en ausencia de oxígeno molecular.
- Microorganismos facultativos: Aquellos capaces de vivir tanto en ausencia como en presencia de O₂.

La última de las clasificaciones se establece en base a la **temperatura** óptima de crecimiento. Según el rango de temperatura óptima al que pertenezcan los microorganismos se dividen en:

- Psicrófilos: Temperaturas inferiores a los 20 °C.
- Mesófilos: Temperaturas comprendidas entre 21 °C y 45 °C.
- Termófilos: Temperaturas superiores a 45 °C.

Los **principales microorganismos** que se encuentran en los un proceso de **fangos activos** son:

- *Bacterias* → Son las responsables de la estabilización de la materia orgánica y de la formación de flóculos.
- *Protozoos* → Son considerados como bioindicadores del estado de funcionamiento del proceso de depuración, destacando en la detección y prevención de problemas en los procesos. Son los principales consumidores de bacterias
- *Hongos* → La mayoría son aerobios estrictos. Son capaces de competir con las bacterias en sistemas de cultivo en suspensión.
- *Metazoos* → Son organismos aerobios y pluricelulares. El grupo más importante es el de los rotíferos. Suelen ser indicativos de edades del fango y tiempos de retención elevados, así como de cargas débiles.
- *Virus* → Los virus son más pequeños que las bacterias. Necesitan otras células vivas para poder multiplicarse.
- *Pequeños invertebrados inferiores*

Las bacterias, hongos y algunos protozoos flagelados son microorganismos principalmente descomponedores de materia orgánica. Los protozoos y metazoos (rotíferos y nematodos) son en general, microorganismos consumidores de materia orgánica.

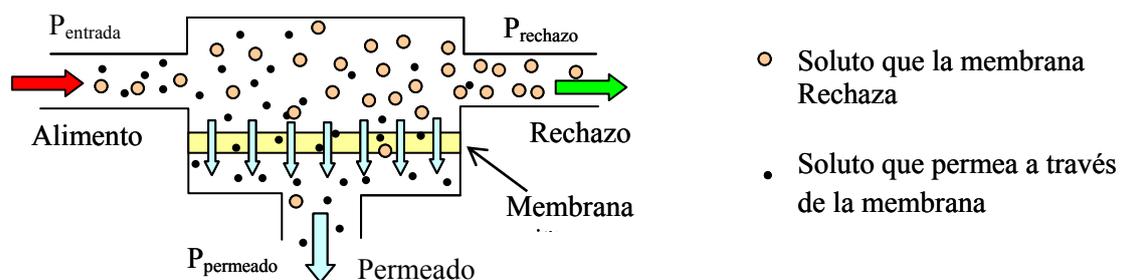
1.3 LA ULTRAFILTRACIÓN Y MICROFILTRACIÓN

Una membrana es una lámina semipermeable que permite el paso selectivo de sustancias a través de ella. El flujo de estas sustancias puede venir determinado por diferentes fuerzas impulsoras, principalmente: la presión, concentración y potencial eléctrico. La selectividad permitirá enriquecer o empobrecer una corriente o carga en una o varias sustancias. El sistema opera generalmente en modo de flujo tangencial.

El alimento se introduce en un módulo en el que se encuentra la membrana, y de él se obtienen dos corrientes: el rechazo o concentrado, que contendrá las sustancias que no han logrado pasar a través de la membrana y el permeado que contendrá las sustancias que sí pueden pasar a través de la membrana.

En la figura 1.2 se muestra un esquema explicando el funcionamiento de una membrana.

Figura 1.2: Esquema de funcionamiento de una membrana



Las operaciones de membrana en las que la fuerza impulsora es el gradiente de presión son las siguientes: Ósmosis Inversa (OI), nanofiltración (NF), ultrafiltración (UF) y microfiltración (MF). Cuando se necesita eliminar sales del agua, se aplican la nanofiltración y la ósmosis inversa. Cuando la filtración de membrana es para retirar partículas más grandes, se aplican la microfiltración y la ultrafiltración.

El caudal de permeado dividido por la superficie activa de la membrana se denomina **flux** o **densidad de flujo de permeado** y se expresa en $\text{m}^3/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$. La densidad de flujo de permeado puede ser descrita mediante la ecuación de Darcy (Ec. 1):

$$J = \frac{PTM}{\mu \cdot R_T} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

- J es la densidad de flujo de permeado ($\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)
- PTM es la presión transmembranal (Pa)
- μ es la viscosidad del permeado (Pa·s)
- R_T es la resistencia a la filtración (m^{-1})

La fuerza impulsora necesaria para que tengan lugar los procesos de separación por membranas es la presión transmembranal que se define como la presión necesaria para hacer pasar el agua a través de la membrana (Ec. 2):

$$PTM = \frac{P_E + P_R}{2} \quad (Ec. 2)$$

Donde:

P_E es la presión a la entrada del módulo de membrana (bar)

P_R es la presión a la salida por el lado del rechazo (bar)

La **conversión** o **grado de recuperación**, se define como el porcentaje de flujo de alimentación que se procesa y se obtiene como producto. Todos los sistemas tienen un mismo objetivo, maximizar la recuperación para que los compuestos que se pretenden separar queden en un volumen tan pequeño como sea posible. En un sistema ideal, dichos compuestos son retenidos por la membrana, saliendo de la misma por la corriente de concentrado.

Cuando la conversión aumenta, la concentración de sustancias a separar en el rechazo aumenta, disminuyendo la pureza del permeado. El objetivo que se persigue es minimizar los volúmenes de rechazo y obtener un permeado con el grado de pureza deseado.

Como las membranas no son ideales, se tiene que considerar la fracción de soluto que pasa a través de ellas. El **índice de rechazo**, se define como (Ec. 3):

$$R (\%) = \frac{C_A - C_P}{C_A} \cdot 100 \quad (Ec. 3)$$

Siendo,

C_A la concentración de soluto a separar en la alimentación

C_P la concentración de soluto en el permeado

1.3.1 MATERIALES DE MEMBRANA

Según el tipo de material con el que se fabrican las membranas, estas se pueden clasificar en orgánicas, si están constituidas por materiales poliméricos, o en inorgánicas, si están constituidas por materiales inorgánicos.

Los materiales más usados para las membranas de un BRM son poliméricos debido a su bajo coste. Los polímeros utilizados en la fabricación de membranas son muy diversos y su utilización depende de la aplicación que vayan a tener, ya que determinan factores tan importantes como las resistencias mecánica, química y térmica.

En general, los polímeros más utilizados en la fabricación de membranas son:

- Polisulfona (PS)
- Acetato de celulosa (AC)
- Poliamidas aromáticas (PA)
- Poliacrilonitrilo (PAN)
- Fluoruro de polivinilideno (PVDF)
- Polietersulfona (PES)
- Polipropileno (PP)
- Polietilenoclorado (PEC)

El uso de membranas inorgánicas es más reciente y ofrecen numerosas ventajas, entre las que cabe destacar que sirven para tratar aguas residuales con cualquier pH y tienen una gran resistencia térmica y mecánica. Su configuración ha sido habitualmente tubular, aunque recientemente también plana. Están compuestas por una capa selectiva de ZrO_2 o Al_2O_3 generalmente, con una capa de apoyo de Al_2O_3 o carbono.

1.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE UF/MF

Para describir el tamaño de las sustancias que separa una determinada membrana se emplea el denominado umbral de corte molecular, conocido con la palabra inglesa “cut-off”, expresado en Daltons. Este concepto se refiere al peso molecular de soluto rechazado por la membrana.

Sin embargo, en MF se utiliza el tamaño nominal de poro en micras para expresar el tamaño de los solutos que se rechazan. En ocasiones también se emplea esta medida en UF.

Se puede decir que una membrana de UF presenta cortes moleculares de 3.000 a 300.000 Daltons, con tamaños de poro entre 0,01 y 0,05 μm aproximadamente, mientras que las membranas de MF presentan un tamaño de poro de entre 0,1 y 0,5 μm .

Otras características de las membranas de UF/MF que pueden ser dadas por el fabricante son el carácter hidrofílico o hidrofóbico, la carga y la rugosidad de su capa activa. Además, es importante conocer las resistencias química, térmica y mecánica de la membrana.

1.3.3 ENSUCIAMIENTO DE LA MEMBRANA

El ensuciamiento, llamado en inglés “fouling” es el principal problema en los procesos de membrana. Consiste en la adsorción y deposición sobre la membrana de diferentes elementos presentes en el agua. El mecanismo de este proceso es consecuencia de la interacción fisicoquímica de estos elementos con la membrana.

En el caso de la depuración biológica, los elementos que suelen producir el fouling son proteínas, materias coloidales o las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, del inglés extracellular polymeric substances) que son metabolitos excretados por la biomasa depuradora.

Existen dos tipos diferenciados de fouling:

- ✓ **Fouling externo o reversible**: las sustancias se depositan sobre la membrana.
- ✓ **Fouling interno o irreversible**: las sustancias taponan los poros del interior de la membrana.

El fouling interno es mayor problema que el externo ya que su eliminación es mucho más complicada y a menudo se ha de sustituir la membrana o realizar agresivos lavados químicos.

Los efectos del fouling irreversible son realmente graves. Sin embargo, el fouling reversible se elimina fácilmente por mecanismos físicos.

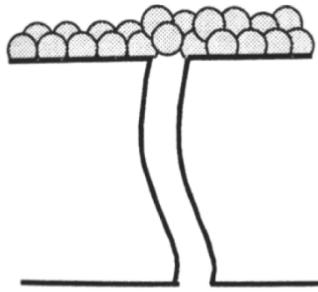
La consecuencia más fácilmente observable es una reducción en el caudal de permeado debido a la obstrucción de los poros, ya sea en el exterior como en su interior. Como consecuencia de este hecho, se incrementa el gasto de energía. Si se quiere mantener un caudal de permeado constante, se ha de aplicar una mayor presión transmembranal lo que conlleva también un mayor gasto energético.

Además, el ensuciamiento de las membranas también es responsable de incrementar la frecuencia de las limpiezas y sustituciones de las membranas con las repercusiones económicas y temporales que esto implica.

Los fenómenos que originan el ensuciamiento pueden ser:

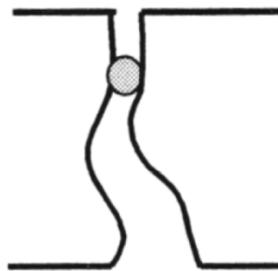
- *Precipitación sobre la superficie de la membrana*: Consiste en la precipitación de partículas de soluto sobre la superficie de la membrana, de manera que los poros quedan tapados. En la figura 1.3 se puede observar el efecto de este tipo de ensuciamiento.

Figura 1.3: Precipitación sobre la membrana



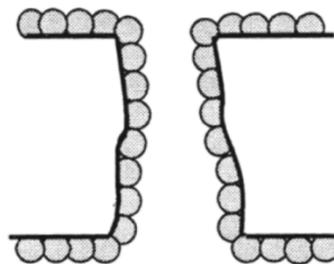
- *Obtención del poro por una partícula:* Puede ocurrir que una partícula quede atrapada a lo largo del poro, de manera que impida el paso a través del mismo (Fig 1.4).

Figura 1.4: Obtención del poro



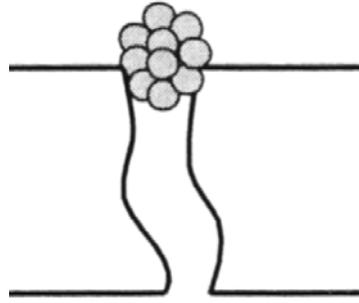
- *Constricción del poro por adsorción en sus paredes:* En este caso, la adsorción de partículas sobre la superficie del material de la membrana es la que causa la reducción efectiva del tamaño de poro, de manera que se reduce el flux de permeado (Fig 1.5).

Figura 1.5: Constricción del poro



- *Obtención del poro por un agregado:* Puede ocurrir que la obtención del poro se efectúe por acción de un agregado de partículas como se muestra la figura 1.6.

Figura 1.6: Obturación por un agregado



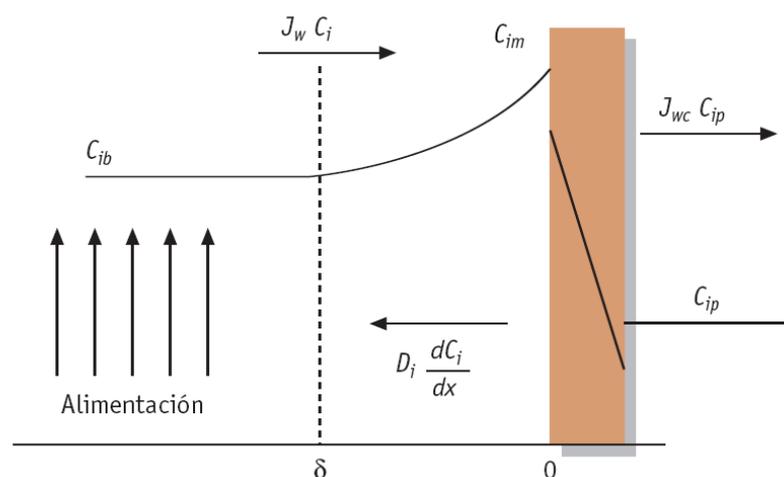
1.3.4 POLARIZACIÓN POR CONCENTRACIÓN

El fenómeno de polarización por concentración tiene lugar en aquellos procesos que operan de forma tangencial. En las condiciones de trabajo de estos procesos es difícil evitar que los componentes de la alimentación rechazados por la membrana se acumulen en su superficie.

El resultado es la creación de gradientes de concentración (polarización de la concentración) en el lado de la alimentación, que pueden disminuir la eficiencia de separación de la membrana y el flujo de permeado (Mulder, 1991).

La figura 1.7 representa la situación en la que un componente i de la alimentación, que es rechazado por la membrana, se acumula en su superficie, creándose un gradiente de concentración localizado en una película de espesor δ , próximo a la membrana.

Figura 1.7: Fenómeno de polarización por concentración



El flujo difusivo de componente i , generado por el gradiente de concentración, se opone al flujo convectivo creado por la diferencia de presión transmembranal, comportándose como una resistencia adicional que contribuye a disminuir el flujo de permeado.

Una polarización de la concentración elevada aumenta la presión osmótica en el lado de la alimentación, lo que también contribuye a la disminución del flujo de permeado. Además, si la concentración C_{im} es elevada se favorecerá la difusión del componente i a través de la membrana, lo que se traduce en una disminución del coeficiente de rechazo.

Este fenómeno depende de las condiciones de operación y no del tiempo de utilización de la membrana. La manera más sencilla de evitar la polarización es aumentando la velocidad tangencial de paso de la alimentación, de tal forma que las turbulencias generadas arrastren a las sustancias depositadas en la superficie de la membrana.

1.4 BIORREACTORES DE MEMBRANA (BRM)

1.4.1 FUNDAMENTOS

En el campo del tratamiento de aguas residuales, la tecnología de membranas en un principio, estaba limitada a tratamientos de afino o sistemas terciarios dentro del proceso convencional. La microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y la ósmosis inversa se utilizaban en áreas donde había requerimientos de vertido muy rigurosos o donde se pretendía reutilizar el agua depurada. Los factores principales que limitaban el desarrollo de la tecnología de membrana eran el elevado coste de inversión y de operación. Por lo que con el desarrollo de módulos de membrana menos costosos y más efectivos junto con el endurecimiento de los requisitos de vertido han hecho que surja un nuevo concepto de tratamiento biológico: el biorreactor de membrana.

Un BRM es un sistema biológico de tratamiento de agua residual, donde la membrana constituye el límite físico que separa la zona donde se produce la degradación biológica de los contaminantes y la zona del agua tratada, libre de contaminantes y microorganismos. La acción de las membranas garantiza un efluente de alta calidad favoreciendo las condiciones necesarias para su reutilización.

Es esencialmente un proceso de lodos activados en el que se ha sustituido el sedimentador de separación de biomasa (clarificador) por un sistema de filtración por membranas de ultrafiltración o microfiltración, que actúa de barrera total frente a sólidos en suspensión (incluye bacterias y gran parte de virus).

Como se ha comentado, los BRM utilizan como elementos de separación sólido-líquido membranas de microfiltración y ultrafiltración. Son muchos los aspectos a tener en cuenta a la hora de escoger un tipo u otro de membrana, influyendo las características del agua de alimentación, la calidad del efluente y los costes que genera todo el proceso de filtración.

La mayoría de los BRM actuales tienen las membranas sumergidas en el reactor, en contacto con la biomasa bacteriana en suspensión (Judd, S., 2006).

El agua filtrada, denominada permeado, constituye el agua tratada, mientras el rechazo de la membrana (biomasa) queda en el reactor, agitado por aire, formando el licor de mezcla. Una vez alcanzada la concentración de biomasa deseada en el reactor se extrae una corriente de fangos concentrados para mantener el régimen estacionario en la operación.

La mayor ventaja de la tecnología de los biorreactores de membrana reside en la posibilidad de reutilizar el efluente obtenido. La utilización de un módulo de UF con un rango de tamaño de poro comprendido entre 0,005 y 0,1 μm permite mejorar la calidad del efluente evitando la presencia de sólidos, materia coloidal, bacterias y algunos virus. Por lo tanto, el efluente obtenido, según el uso final que se le quiera dar, puede ser

reutilizado directamente o utilizado como alimentación a un proceso de electrodiálisis reversible u ósmosis inversa.

Con objeto de provocar alta turbulencia en las proximidades a la superficie filtrante de las membranas, y reducir así la velocidad de ensuciamiento, se introduce por el fondo de cada módulo de membranas un flujo de aire en forma de burbujas gruesas, en régimen continuo o intermitente.

En los BRM no se da el problema de la sedimentabilidad de la biomasa que se daba en el sedimentador de fangos activos convencional. Por ello, en los BRM se puede utilizar en el reactor una concentración alta de biomasa, lo que hace que el sistema resulte más compacto y efectivo en la eliminación de sustrato. Sin embargo, tal concentración no puede ser excesivamente alta debido a diversos tipos de problemas, tales como la limitación en la transferencia de oxígeno, el incremento de la viscosidad, los cambios en los mecanismos de ensuciamiento de las membranas, etc.

Al no existir problemas de sedimentabilidad de la biomasa, en los BRM se puede llevar a cabo el proceso de eliminación de nutrientes (especialmente nitrógeno) por vía biológica en una sola etapa, de forma que incrementando el tiempo de residencia celular en el reactor se consigue eliminar la materia orgánica biodegradable y conseguir la nitrificación del nitrógeno amoniacal; la recirculación hacia una zona anóxica permite realizar el proceso de desnitrificación. De esta forma, el permeado estará libre de materia orgánica y de nitrógeno.

Las nuevas tecnologías de membranas se están imponiendo en el mercado pero sus costes son aún elevados. El problema principal está en el ensuciamiento de las membranas durante la filtración, fenómeno todavía pendiente de resolver definitivamente, pues los mecanismos son muy complejos, especialmente cuando intervienen procesos biológicos acoplados.

Los estudios relacionados con la filtrabilidad de la biomasa en membranas de ultrafiltración o microfiltración, en función del grado de nitrificación conseguido en un reactor biológico, o de las características fluidodinámicas del sistema son de suma actualidad, e implican el conocimiento de los mecanismos de ensuciamiento, del comportamiento de los microorganismos en diferentes condiciones de operación, etc.

1.4.2 EVOLUCIÓN HISTÓRICA

La investigación y la comercialización de los biorreactores de membrana comenzó hace unos 40 años cuando se empezó a considerar la combinación de membranas con un proceso biológico como un sistema óptimo para el tratamiento de las aguas residuales.

La idea de sustituir el decantador secundario por un proceso de UF dentro del proceso convencional de fangos activados se le atribuye a Smith et al. en 1969. Otra de las

primeras aportaciones fue la de Hardt et al., (1970) que utilizó un biorreactor aerobio de 10 litros de capacidad con una membrana de UF para tratar un agua residual sintética.

En la década de los 60 la compañía Dorr-Oliver desarrolló un sistema para el tratamiento de aguas residuales llamado Membrane Sewage Treatment (MST) basado en el sistema de membranas (Bemberis et al, 1971). En el sistema MST el agua de alimentación entraba en un biorreactor desde donde se enviaba de forma continua a un módulo de ultrafiltración.

En la década de los 70 la tecnología entró por primera vez en el mercado japonés gracias a un acuerdo entre las compañías Dorr-Oliver y Sanki Engineering. También en la década de los 70, Thetford Systems, actualmente parte de Zenon Environment, lanzó su versión de un sistema externo (“proceso Cycle-Let”) para el tratamiento aeróbico de las aguas residuales.

En los 80 y 90 Zenon Environment continuó desarrollando sistemas para el tratamiento de efluentes industriales. En 1982, Dorr – Oliver introdujo el sistema de reactor anaeróbico de membrana (MARS) para el tratamiento del efluente de una industria alimentaria. El proceso contaba con una unidad de UF externa al biorreactor.

Casi al mismo tiempo, en la década de los 80, se desarrollaron en el Reino Unido dos sistemas BRM con MF y UF (Choate et al., 1983; Anderson et al., 1986).

Hasta los años 90 no se fabricaron membranas adecuadas para su implantación a nivel industrial. En 1989 el Gobierno Japonés junto con una serie de importantes compañías acordó invertir en el desarrollo de un sistema que fuese compacto y que produjese un efluente de elevada calidad de forma que permitiese la reutilización del agua. La compañía Kubota desarrolló un sistema BRM en el que una membrana de placas estaba inmersa en el biorreactor (Churchouse and Wildgoose, 1999).

En el año 1993 se instalaron treinta y nueve biorreactores de membrana con configuración externa con diversas aplicaciones tanto para el tratamiento de aguas sanitarias como industriales (Aya, 1994).

La primera planta BRM europea se instaló en 1998 en Porlock (Gran Bretaña) con membranas planas de MF de Kubota, diseñada para 3.800 hab.

Actualmente, los biorreactores de membrana están muy implantados en Japón y varias compañías ofrecen procesos para el tratamiento y reutilización del agua para varias aplicaciones industriales principalmente en industrias alimentarias y de bebidas en las que son comunes valores elevados de DQO.

La primera generación de BRMs fue operada con membranas tubulares orgánicas o inorgánicas colocadas externamente al reactor biológico, en las que se bombeaba la biomasa del reactor a un módulo de membranas. A principios de los 90 surgió la idea de introducir el módulo dentro del reactor biológico, simplificando así el proceso (Yamamoto et al., 1989).

En España han comenzado a instalarse los BRMs ya a principios de este siglo, instalándose la primera planta de la Comunidad Valenciana en 2007 en Torrellver (Castellón).

El estado de la tecnología actual ha alcanzado un importante desarrollo en los últimos años de forma que los BRM están siendo cada vez más aceptados para el tratamiento tanto de aguas residuales municipales como para el tratamiento de efluentes industriales.

La mayor ventaja potencial de esta tecnología está en el campo de la reutilización. El uso del agua depurada supone en España un 0,75%, de la demanda nacional. El Plan Hidrológico Nacional incluye proyectos de reutilización de aguas residuales que actualmente son vertidas al mar, gracias a los cuales, se prevé conseguir un porcentaje de uso en torno al 3% en el año 2012, lo que supone cuadruplicar el uso actual.

La investigación en el campo de los MBR está actualmente en continuo desarrollo dado el gran interés comercial suscitado. Es de prever que la tendencia continuará en el futuro y que el número de biorreactores de membranas sufrirá un incremento importante.

1.4.3 EL MERCADO ACTUAL DE LOS BRM

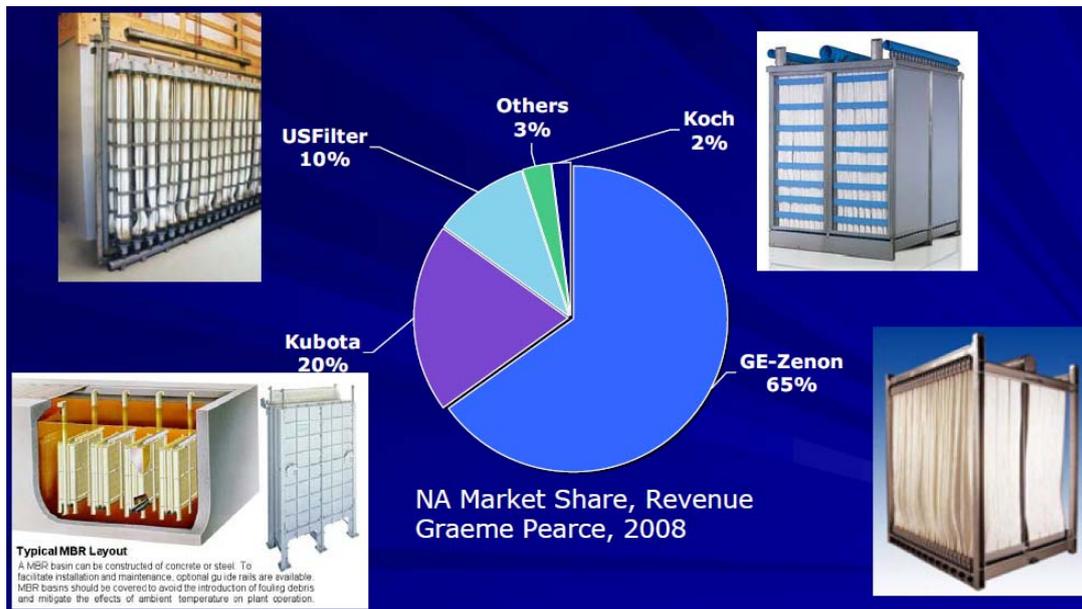
Aunque existen más de 20 compañías que actualmente comercializan la tecnología, dos son las principales que se imponen en el mercado mundial: GE Water & Process Technologies y Kubota, ambas con tecnologías diferentes. El módulo de GE (ZeeWeed® 500) es de fibra hueca, mientras que Kubota utiliza un módulo de membrana plano (ES, single-deck; EK, double 510).

Desde 1995, ambas compañías han experimentado un aumento exponencial en su capacidad instalada, decantándose Kubota por pequeñas instalaciones y GE-Zenon por aquellas de mayor capacidad. Actualmente, hay más de 2200 instalaciones (Yang, 2005), siendo la mayor planta instalada la de Traverse City (Michigan, EEUU) con una capacidad de 64.000 m³/d y estando en fase de construcción otra planta de 375.000 m³/d en Kuwait.

Los sistemas comerciales actuales tienden a la utilización de la configuración sumergida, en la que el módulo se introduce directamente en el biorreactor.

Los países en los que más se ha extendido esta tecnología son Japón (que cuenta aproximadamente con el 66% de los procesos a nivel mundial) y Estados Unidos, seguidos de los países europeos. En la figura 1.8 se muestra la situación de las principales empresas distribuidoras de membranas para BRM.

Figura 1.8: Distribución de casas comerciales de membranas para BRM. Fuente: IWA, MBR-Network Workshop



1.4.4 CONFIGURACIONES DE LOS BRM

Los biorreactores de membrana están compuestos por dos partes principales, la unidad biológica responsable de la degradación de los compuestos presentes en el agua residual y el módulo de la membrana encargado de llevar a cabo la separación física del licor de mezcla.

Dependiendo del diseño, se distinguen dos tipos configuración, que se diferencian fundamentalmente en la ubicación de las membranas y en la tecnología utilizada para crear el gradiente de presión que constituye la fuerza impulsora del proceso de filtración.

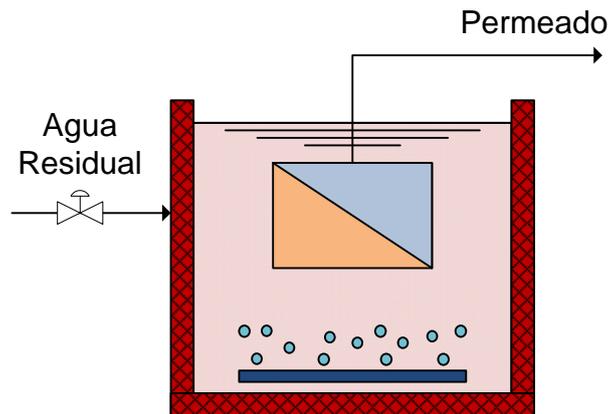
- *Biorreactores con membrana integrada o sumergida:*

En la figura 1.9 se muestra un esquema del mismo. En esta configuración la unidad de membranas está inmersa en el tanque biológico. La fuerza impulsora a través de la membrana es alcanzada presurizando el biorreactor o creando presión negativa en el lado permeado de la membrana mediante la aspiración a través de la propia membrana.

Generalmente, se coloca un difusor de aire justo debajo del módulo de membranas el cual cumple una triple función:

1. Suministrar el aire necesario para homogeneizar el contenido del tanque.
2. Realizar el aporte de oxígeno necesario para mantener el proceso biológico.
3. Generar un flujo cruzado que provoque la turbulencia necesaria para dificultar las deposiciones sobre la membrana.

Figura 1.9: BRM con membrana sumergida



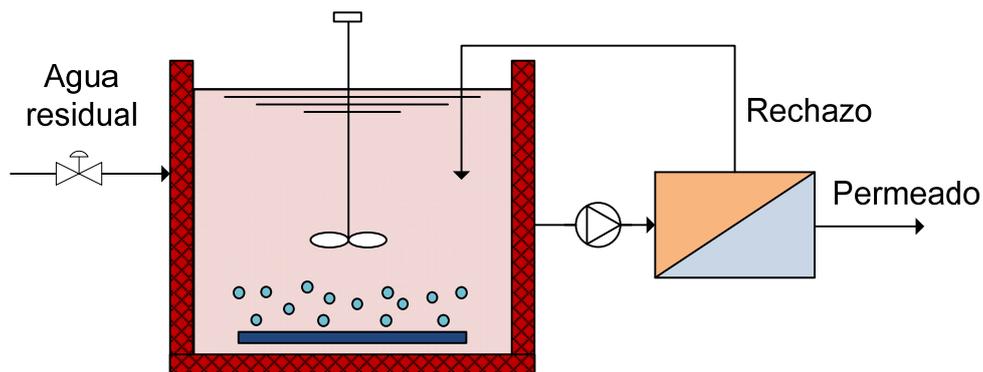
- *Biorreactores con membrana externa:*

Esta configuración (figura 1.10) implica que el licor de mezcla es recirculado desde el biorreactor hasta la unidad de membranas que se dispone externamente a la unidad biológica. La fuerza impulsora es la presión creada por el bombeo hacia el módulo, siendo muy elevada la velocidad tangencial a la membrana.

La ventaja de los BRM con membranas exteriores está en que facilitan la operación al poderse manipular los tanques independientemente, de modo que se pueden gestionar las membranas sin influir en el reactor (realizar limpiezas químicas, mantenimiento...) y se puede vaciar el reactor sin peligro de dañar las membranas.

En cambio, los inconvenientes que tienen es que el gasto energético es superior y es necesaria una unidad de bombeo para la recirculación.

Figura 1.10: BRM con membrana externa



La aplicación para la que se diseña un BRM condiciona el tipo de membranas empleado. Mientras que en las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales son más comunes los BRM sumergidos y los externos de módulos tubulares, en las aguas residuales urbanas los BRM sumergidos con placa plana o fibra hueca son los más utilizados.

Para comparar ambos tipos de configuración, en primer lugar se compara la presión de trabajo. La presión transmembranal constituye la fuerza impulsora en el proceso. En el caso de los biorreactores con membrana sumergida, el rango de PTM a las que se trabaja es menor que en el caso de reactores con configuración externa, pudiéndose trabajar en rangos de presión del orden de 0,05 bares a 0,5 bares, mientras que en los de configuración externa, las PTM suelen estar entre los 0,5 y 5 bares. Así pues, en cuanto a este factor, los biorreactores de membrana sumergida tienen una ventaja importante. Al trabajar en rangos de presión menores, los costes de operación pueden ajustarse más, y al mismo tiempo, y puesto que el estrés mecánico al que están expuestas las membranas es menor, se produce un aumento de su vida útil.

La siguiente comparación que se debe hacer es la económica. Los BRMs de membrana sumergida requieren una inversión inicial mayor y el coste de aireación también es superior debido a la triple función de los difusores como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, los costes de operación totales en los BRM de configuración externa son mayores, debido a que los requerimientos de bombeo son mucho mayores. Hay que considerar que la concentración de sólidos en el licor de mezcla es elevada por lo que los costes derivados del bombeo se disparan.

El consumo de energía surge de los requerimientos de potencia del proceso. En un sistema de BRM, los requerimientos de potencia vienen del bombeo del agua de alimentación, de la aireación, de la succión de permeado, y de la recirculación. Se observa por lo tanto, que en los BRM sumergidos el consumo de energía debido al bombeo es nulo, lo que deriva en que el consumo de energía para un sistema en circuito cerrado es normalmente dos órdenes de magnitud mayor que en los sistemas integrados. Según Stephenson et al. (2000), el consumo de energía para módulos de membrana externa es de 2-10 KWh/m³ mientras que para las sumergidas es de 0,2-0,4 KWh/m³.

Las razones económicas son las que justifican mayormente que se estén imponiendo los sistemas de membranas sumergidas.

Otro aspecto clave en todos los procesos de membranas es el ensuciamiento y las consiguientes necesidades de limpieza. En este aspecto, los BRMs sumergidos también mejoran las prestaciones de los de configuración externa ya que tienen unas necesidades de mantenimiento por limpieza menores. Aunque en los diseños de membrana externa el flujo tangencial asegure un cierto grado de autolimpieza también es cierto que trabajan en rangos de PTM sensiblemente superiores. Además, los reactores de membranas sumergidas tienen diseños en los que se aprovecha la aireación para conseguir un efecto de limpieza permanente durante la operación de modo que se consiguen retrasar las paradas para mantenimiento por limpieza.

En la tabla 1.3 se recoge un resumen de la comparación entre ambas configuraciones.

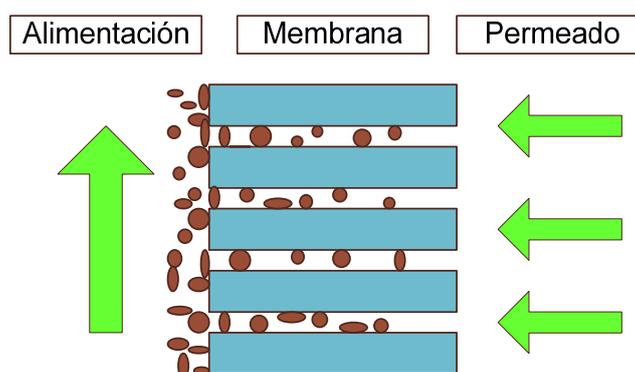
Tabla 1.3: Comparación entre membranas externas y sumergidas

Parámetro	Membrana sumergida	Membrana externa
Costes de aireación	Altos (90%)	Bajos (20%)
Costes de bombeo	Muy bajos (10%)	Altos (60-80%)
Flujo de operación	Bajo (10-60 L/m ² ·h)	Alto (40-120 L/m ² ·h)
Frecuencia de limpieza	Baja	Alta
Costes de operación	Menores	Mayores
Inversión inicial	Mayor	Menor
PTM	Menor (0.05-0.5 bar)	Mayor (0.5-5 bar)

1.4.5 LIMPIEZA DE LAS MEMBRANAS

En el caso de membranas sumergidas con configuración de fibras huecas y de la membrana plana contralavable de Microdyn Nadir, para reducir la velocidad de ensuciamiento de la membrana, y con ello aumentar su vida operativa, se recurre a procesos de limpieza mecánica periódica a través de un lavado con permeado por inversión de flujo (contralavado) durante cortos periodos de tiempo. De esta forma se elimina la capa externa de ensuciamiento de fibra y parte de las partículas que se han introducido en sus poros. En la figura 1.11 se muestra un esquema de este tipo de limpieza.

Figura 1.11: Esquema de contralavado

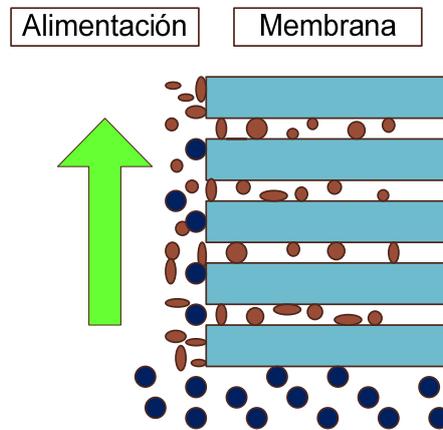


Por otra parte, cada cierto tiempo es necesario realizar una limpieza de tipo química para recuperar el estado cuasi inicial de la membrana. Las limpiezas químicas, tanto de las membranas planas como de las de fibras huecas, se realizan prácticamente siempre con hipoclorito sódico. En caso de pérdida de flux por precipitación de sales se realizará una limpieza ácida, si bien para el caso de aguas residuales urbanas no es en principio necesario.

Como se ha comentado previamente, con objeto de provocar alta turbulencia en las proximidades a la superficie filtrante externa de las membranas, y reducir así la

velocidad de ensuciamiento, se introduce por el fondo de cada módulo de membranas un flujo de aire en forma de burbujas gruesas, en régimen continuo o intermitente. (Figura 1.12).

Figura 1.12: Esquema de limpieza mediante aireación



1.4.6 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS BRM

El objetivo de este apartado es comentar las ventajas y los inconvenientes que presentan los biorreactores de membrana. Así, en comparación con otros procesos biológicos, el BRM ofrece las siguientes *ventajas*:

1. Mayor calidad del agua tratada:

Este sistema permite tratar el agua residual biológicamente y por medio de membranas que retienen los sólidos suspendidos dentro del biorreactor proporcionando un efluente de excelente calidad. La membrana puede retener material soluble de elevado peso molecular, aumentando su tiempo de retención. Además, como retiene virus y bacterias presentes en las aguas residuales, garantiza la desinfección del efluente.

Se emplea en casos de necesidad de un grado de depuración elevado: vertido a cauce público, zonas sensibles o pago de un canon de vertido elevado.

2. Flexibilidad de operación:

La sustitución del decantador secundario por un módulo de membranas para la separación de la fracción sólida de la líquida del agua residual, permite que en los BRM el tiempo de retención celular se pueda manejar independientemente del tiempo de retención hidráulico, lo que permite un control óptimo de las reacciones biológicas y una mayor fiabilidad y flexibilidad de uso.

3. Posibilidad de operar con altas concentraciones de biomasa:

La operación del reactor biológico a altas concentraciones de biomasa, debido a la presencia de la membrana, permite mantener una edad de fango elevada. Esto, unido al control completo de la edad del fango, permite el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento como las bacterias nitrificantes. Asimismo, estas características operacionales inhiben el crecimiento de los organismos filamentosos, causantes de problemas de operación como bulking y espumas.

4. Tamaño compacto de la planta:

El proceso BRM típicamente maneja concentraciones de sólidos suspendidos en el licor de mezcla en la gama de 8.000 a 12.000 mg/L, que son considerablemente mayores que en procesos de fangos activos convencionales. La elevada concentración de SSLM permite que valores convencionales de carga orgánica puedan ser alcanzados con tiempos de residencia hidráulica muy inferiores.

Además, hay un ahorro muy importante en espacio puesto que se elimina el decantador secundario y el tratamiento terciario para llegar a una misma calidad del agua tratada que en sistemas convencionales seguidos de un proceso terciario.

5. Capacidad de expansión:

El equipo BRM es de naturaleza modular y por lo tanto permite la construcción o la extensión de la planta que puede ser completada en fases durante la vida del equipo.

6. Baja producción de fangos:

Las altas edades del fango frecuentemente utilizadas en los BRM explican la baja producción de fango. Esta reducción de fango con respecto a los procesos convencionales (hasta un 80%) deriva también en una disminución en los costes de tratamiento del fango.

7. Bajos requerimientos de mano de obra:

Los tratamientos con BRM tienen la capacidad de funcionar correctamente sin la necesidad de que los operarios estén continuamente vigilando. Además no es necesario el conocimiento exhaustivo sobre aspectos microbiológicos del proceso. En cambio, en los tratamientos convencionales la posibilidad de crecimiento de organismos filamentosos puede reducir la calidad del efluente, por lo que es necesaria una supervisión constante por personal cualificado.

8. Fiabilidad del proceso:

Debido a que los BRM trabajan con valores muy bajos de carga orgánica, y la membrana constituye una barrera para la descarga de partículas, la calidad del efluente de un BRM no es vulnerable a los picos hidráulicos u orgánicos que pueden afectar negativamente a la calidad de efluente en el proceso convencional.

Por el contrario, el BRM ofrece las siguientes *desventajas*:

1. Costes:

Las principales limitaciones de la tecnología BRM tienen principalmente carácter económico ya que requiere una inversión inicial importante debido al elevado precio de las membranas.

Además, para lograr las presiones requeridas en el sistema, estos tratamientos conllevan un gasto energético elevado, el cual se ve incrementado en el caso de los BRM con configuración externa debido a la recirculación de la biomasa. Además, deben añadirse los gastos procedentes de la limpieza de las membranas por lo que esta tecnología lleva implícitos elevados costes de implantación y explotación.

2. Ensuciamiento de las membranas:

La acumulación de partículas en las membranas es uno de los principales inconvenientes encontrados, tanto a nivel operacional como a nivel de costes. El fouling de las membranas produce una disminución en el flujo de permeado, lo que conlleva que deban realizarse ciclos de limpieza para restaurarlo, aumentando los costes operacionales del sistema.

3. Tratamiento de fangos más complicado:

Dado que la mayoría de los sólidos en suspensión son retenidos en el reactor, se opera en rangos de concentración donde los fangos pueden presentar problemas de sedimentabilidad y donde la deshidratación es más difícil, probablemente por la presencia de polímeros extracelulares. Asimismo, también se ha demostrado que la viscosidad del fango aumenta con el tiempo de retención celular, por lo que se recomienda no superar concentraciones de biomasa de 25.000 mg/L.

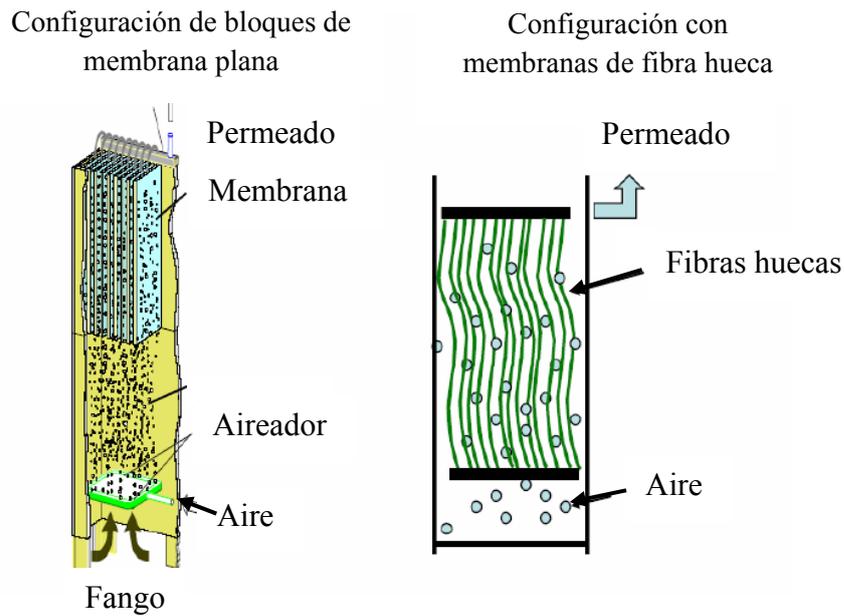
4. Acumulación en el biorreactor de compuestos inorgánicos no filtrables:

Otra limitación de los BRM es la posible acumulación en el biorreactor de compuestos inorgánicos no filtrables como metales pesados que a determinadas concentraciones pueden ser dañinos para la población bacteriana o afectar a la integridad de la membrana.

1.4.7 CONFIGURACIÓN DE LAS MEMBRANAS EMPLEADAS EN BRM

Las configuraciones de las membranas utilizadas comúnmente en los BRM sumergidos son de dos tipos: membranas planas y de fibra hueca, cuyos esquemas se muestran en la figura 1.13.

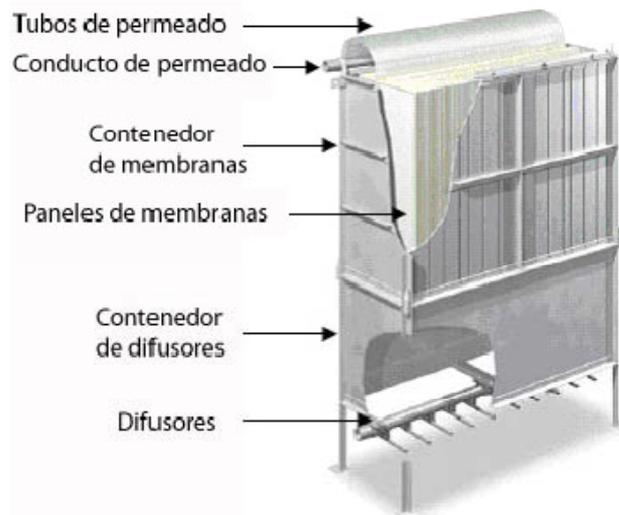
Figura 1.13: Tipos de membranas para BRM



- *Membranas planas:*

Estas membranas ofrecen un mejor flujo tangencial a lo largo de las membranas, una relación superficie de membrana/volumen baja y por lo general no es posible un contralavado (aunque el fabricante Microdyn Nadir GmbH sí comercializa membranas contralavables). Los módulos para membranas planas (tipo placa-bastidor) son los primeros que se utilizaron y tienen una disposición semejante a los filtros-prensa. Las membranas se disponen en bastidores separados por placas. La alimentación impulsada al crear una depresión en el lado de permeado, circula por los espacios placa-membrana, concentrándose en contaminantes conforme avanza el flujo de permeado a través de las paredes de las membranas. Estos sistemas presentan la desventaja de no proporcionar una gran superficie de membrana por unidad de volumen de módulo. Por contra, tienen la ventaja de poder ser montados y desmontados fácilmente. A modo de ejemplo se muestra la figura 1.14.

Figura 1.14: Módulo de membranas planas de Kubota

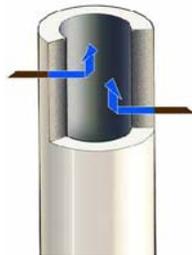


- *Membranas poliméricas de fibra hueca:*

Las membranas de fibra hueca son las más utilizadas y se caracterizan por tener densidad alta (es decir, la relación entre el área de membrana efectiva y el volumen del módulo es muy alta), tener posibilidad de contralavado (es decir, bombeo de permeado desde el lado del permeado al de alimentación de la membrana para su limpieza) y presentar un bajo caudal tangencial a lo largo de las membranas.

Necesitan un ligero vacío para conseguir la filtración, el flujo del agua a tratar va desde el exterior de la membrana al interior de la fibra hueca (fig. 1.15). A medida que se extrae el permeado, la fibra aumenta su resistencia al paso de líquido debido a su ensuciamiento, por lo cual, para mantener el caudal de permeado es necesario aumentar el vacío hasta alcanzar el límite mecánico que soporta la propia membrana.

Figura 1.15: Detalle de funcionamiento de una fibra hueca de GE-Zenon



Cada módulo de membranas está formado por miles de fibras, dispuestas verticalmente, y unidas por sus extremos a dos cabezeras plásticas en el caso de las membranas de Zenon (Fig 1.17) y unidas sólo por la parte inferior en el caso de las de Koch; esto les permite moverse libremente de modo que los residuos acumulados pueden desprenderse libremente gracias al burbujeo y el permeado se recoge por la parte inferior (Fig. 1.16).

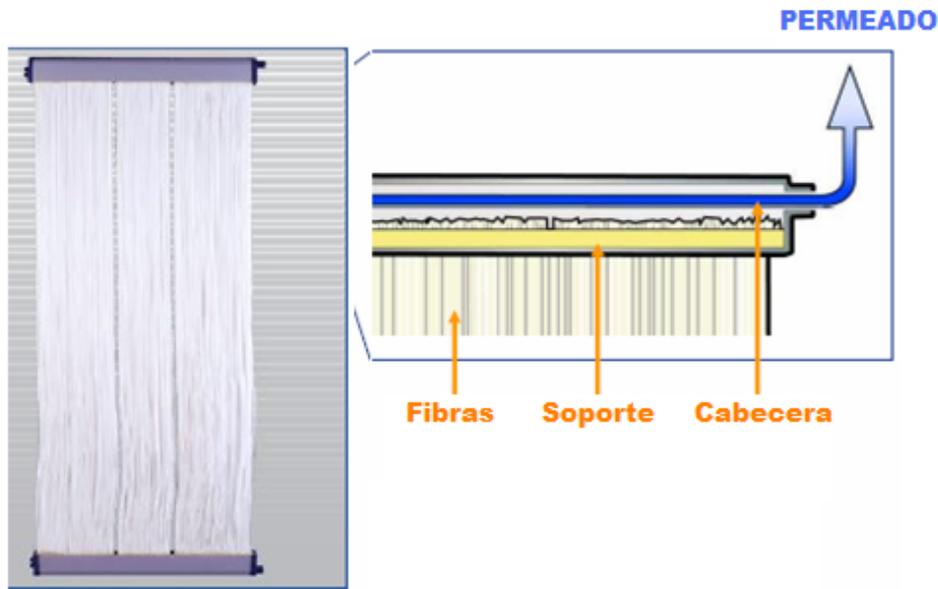
Figura 1.16: Membranas de fibra hueca de Puron (Koch)



Las fibras no están tensas, sino que tienen una cierta holgura, de manera que durante el funcionamiento normal están en movimiento. Este factor, según el fabricante previene la creación de una capa de sólidos alrededor de las fibras, y reduce su ensuciamiento.

Como se puede observar además en la figura 1.17 (detalle), en las membranas de Zenon la misma fuerza impulsora que propicia el proceso de filtración (la presión transmembranal) conduce el permeado hasta la parte alta del módulo desde donde pasa a los circuitos de permeado.

Figura 1.17: Módulo de membranas de fibra hueca. Fte: Zenon



Los módulos se unen para formar un *cassette*, que es la unidad más pequeña de acción del sistema de filtración. El número de módulos que forman cada *cassette* varía en función de la caudal a tratar. Varios *cassettes* unidos forman lo que se conoce como *tren de filtración*, que es la unidad de proceso que se sumerge en el tanque de membranas.

En la tabla 1.4, se recoge un resumen de los dos tipos de configuraciones de las membranas.

Tabla 1.4: Comparación entre configuraciones planas y fibra hueca

FIBRA HUECA	PLANAS
Menor superficie requerida	Mayor superficie requerida (utilización de zona de membranas como zonas de proceso)
Menor energía de agitación	Mayor energía de agitación
Requiere tamizado previo de 1 mm o inferior	Tamizado previo de 3 mm o inferior
Concentraciones óptimas de trabajo 8.000 mg/L	Concentraciones óptimas de trabajo 10.000-12.000 mg/L
Mayor complejidad de operación, requiere lavados continuos	Menor complejidad de operación. Lavados poco frecuentes

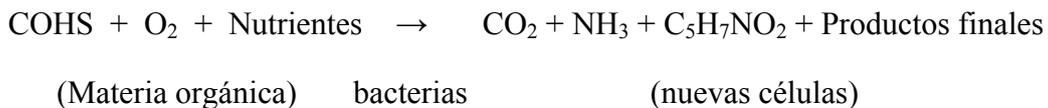
1.4.8 PARÁMETROS DE DISEÑO DE UN BRM

El proceso de BRM como se ha comentado anteriormente puede dividirse en dos etapas: una degradación biológica de la materia orgánica y una filtración por membranas. Cada una de estas etapas puede considerarse y tratarse de forma independiente, pero hay que tener en cuenta que el conjunto de las dos influirá en los parámetros de diseño.

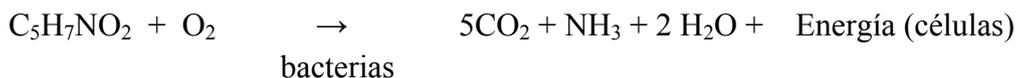
Los criterios de carga hacen referencia a la parte biológica de los BRM y consideran una serie de parámetros para su control y diseño. Estos parámetros son: la carga másica, la edad del fango, el tiempo de retención hidráulica (TRH) y la carga volumétrica. Estos son los mismos parámetros que se emplean en el proceso convencional, pero en el caso de los BRM se tiene un módulo de membranas que influirá de forma significativa en los valores que estos tomarán.

Al igual que para el caso del proceso de fangos activos, el agua residual con residuo orgánico se introduce en el reactor, donde se mantiene un cultivo de microorganismos que se encarga de la degradación de la materia orgánica siguiendo las ecuaciones que se presentan a continuación:

- Oxidación y síntesis:



- Respiración endógena:



La colonia microbiana presente en un BRM es muy compleja, y como en todo proceso biológico se compone de varias especies de bacterias y microorganismos. Las bacterias, o están aglutinadas en flóculos o son células que navegan libremente (bacterias libres nadadoras).

En los BRM, los microorganismos emplean la materia orgánica principalmente para proveerse de energía para su mantenimiento básico, en lugar de emplearlo para su crecimiento. Las elevadas velocidades tangenciales limitan el tamaño de los flóculos.

Un estudio realizado por Cicek et al. (1997) constató el carácter complejo de la población microbiológica presente en los BRM que tendría las siguientes características:

- Flóculos pequeños (mientras que en un proceso convencional de fangos activados nos encontramos con flóculos de tamaños en torno a los 20 μm en un proceso BRM el tamaño medio de los flóculos está en torno a 3,5 μm).

- Gran número de bacterias libres nadadoras.
- Escasa presencia de organismos filamentosos o ciliados.
- Nula presencia de nemátodos.

La alta concentración de SSLM en el reactor junto con los valores bajos de carga másica favorecen que las bacterias compitan por el alimento por lo que se favorece la adaptación de las mismas para degradar sustrato complejo. Por otro lado, las altas edades del fango a las que se opera favorece que estén presentes en el sistema microorganismos de crecimiento lento más adaptados a la degradación de dicho sustrato.

La no producción de fango puede conseguirse cuando toda la alimentación orgánica entrante es utilizada para el mantenimiento de la célula y no para su crecimiento. Además, el tamaño pequeño de flóculo favorece la accesibilidad del oxígeno y la materia orgánica a los microorganismos, hecho que se traduce en un aumento de la actividad del sistema.

1.4.8.1 Edad del fango

Representa la relación expresada en días, entre la masa de fangos en el reactor y la masa de fangos eliminada de la instalación diariamente. Este parámetro da una idea acerca del tiempo de retención de los microorganismos en la instalación. Se determina mediante la ecuación 4.

$$\theta = \frac{V \cdot \text{SSLM}}{Q_W \cdot \text{SS}_W + Q_M \cdot \text{SS}_M} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde,

- V: volumen del reactor (m³)
- Q_w: caudal de fango purgado (m³/d)
- SS_w: concentración de microorganismos en el fango (mg/L)
- Q_M: caudal del efluente de la unidad de membranas (m³/d)
- SS_M: concentración de microorganismos en la unidad de membranas (mg/L)
- SSLM: concentración de microorganismos en el tanque de aireación (mg/L)

Un incremento de la concentración de biomasa en el tanque de aireación supone un aumento del tiempo de retención de sólidos (edad del fango). Concretamente, los BRM suelen operar con edades de fango comprendidas entre 20-40 días (Yoon, et al., 2004).

El control completo de la edad del fango es especialmente importante para permitir el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento como las bacterias nitrificantes.

1.4.8.2 Carga másica

La carga másica se define como la relación existente entre la cantidad de microorganismos del reactor y la materia orgánica presente en el agua residual. Se comporta de manera inversa a la edad del fango. La concentración de biomasa es inversamente proporcional, con lo que al operar con mayores concentraciones de biomasa la relación alimento/microorganismos disminuye. Se calcula mediante la ecuación 5.

$$C_m = \frac{Q_E \cdot DBO_5}{V \cdot SSLM} \quad (Ec. 5)$$

Siendo,

V: volumen del reactor (m³)

Q_E: caudal de entrada (m³/d)

SSLM: concentración de microorganismos en el tanque de aireación (mg/L)

DBO₅: demanda biológica de oxígeno en el influente (mg/L)

Según (Yoon, et al., 2004) se puede tomar como valores de referencia el rango comprendido entre 0,01 y 0,15 kg DBO₅/kg SSLM·día.

1.4.8.3 Tiempo de retención hidráulico

Para el diseño de un reactor, el TRH es uno de los parámetros más importantes ya que representa el tiempo de permanencia del agua en el volumen del reactor.

Se expresa según la ecuación 6:

$$TRH = \frac{V}{Q_E} \quad (Ec. 6)$$

Donde,

V: volumen del reactor (m³)

Q_E: caudal de entrada (m³/d)

Largos tiempos de retención celular causan una menor producción de fango mientras que el bajo valor de la carga másica permite reducir el tiempo de retención hidráulica, en los BRM suele estar entre 0,5 y 8 h (Gander, et al., 2000).

Así, al trabajar en los BRM con TRH inferiores a los del proceso convencional, para un mismo caudal de alimentación, se requerirán volúmenes del reactor más pequeños, con lo que una planta de tratamiento de aguas residuales con BRM ocupará un espacio menor.

1.4.8.4 Carga volumétrica

La carga volumétrica hace referencia al valor de materia orgánica por unidad de volumen del reactor. Se expresa mediante la ecuación 7:

$$C_V = \frac{Q_E \cdot DBO_5}{V} \quad (Ec. 7)$$

Siendo,

V:	volumen del reactor (m ³)
Q _E :	caudal de entrada (m ³ /d)
DBO ₅ :	demanda biológica de oxígeno en el influente (kg/m ³)

De la ecuación anterior puede deducirse que si se trata un mismo influente de agua residual mediante un MBR y un proceso de fangos activados, la carga volumétrica será mayor en el caso de los biorreactor de membranas debido a que suele tener un volumen de reactor menor.

1.4.9 FORMAS DE OPERACIÓN DE UN BRM

La operación de un BRM en depuradoras de aguas residuales urbanas se ha de realizar a caudal constante. Por ello, a medida que la membrana se va ensuciando se debe aumentar la presión transmembranal, para mantener el caudal constante. Al superar un cierto límite de presión se tiene que proceder a la limpieza de la membrana.

1.4.9.1 Flux de operación

La densidad de flujo de permeado o flux, es el principal parámetro de diseño de un BRM. El valor de flux escogido nos da la superficie de la membrana a instalar. Por ello, a mayor flux de diseño de la membrana, menor superficie de membrana se requerirá. Sin embargo, a mayor flux el ensuciamiento que se produce es mayor, por lo que se ha de llegar a una solución de compromiso.

Howell (1995) definió para la MF el denominado flux crítico como aquel por debajo del cual no existe ensuciamiento alguno causado por los coloides, por lo que cualquier planta de membranas que emplee esta tecnología se ha de operar por debajo de estos valores de flux (condiciones sub-críticas).

Sin embargo, la experiencia ha demostrado que a largo plazo existe un ensuciamiento aunque se opere por debajo del flux crítico. En BRM se puede definir como una transición entre permeabilidad constante y no constante, entre ensuciamiento reversible e irreversible, hablándose en ocasiones de flux sostenible en lugar de flux crítico para establecer el flux de diseño (Guglielmi et al. 2007).

1.4.9.2 Aireación

Los difusores se colocan bajo las membranas de modo que las burbujas provoquen turbulencia impidiendo que los flóculos del licor de mezcla queden adheridos sobre la superficie de las membranas. En la fig. 1.18 se observan los difusores.

Figura 1.18: Difusor de aireación



Como se ha comentado anteriormente, los difusores de aireación cumplen una triple función.

1. Sirven para mantener la biomasa en estado de mezcla completa mediante un flujo turbulento. De esta manera se evita tener que instalar agitadores mecánicos para mantener el licor de mezcla homogéneo y se evitan deposiciones de la biomasa por efecto sedimentación.
2. Son los encargados de proporcionar la cantidad de oxígeno necesaria para sustentar el proceso biológico. Esta función junto con la anterior, se desarrollan en el tanque de aireación por medio de difusores. Este tipo de difusores se caracteriza por conseguir mayores eficiencias en la transferencia de oxígeno.
3. Limpieza de las membranas, los difusores proporcionan un sistema de limpieza en continuo de la membrana debido a la fuerza de barrido que produce el flujo tangencial.

En el proceso de los BRM, la demanda de oxígeno para el proceso biológico se ve incrementada respecto a la del proceso de fangos activados por dos motivos principales. En primer lugar, la mayor concentración de biomasa provoca que haya un mayor número de microorganismos oxidando la materia orgánica del influente, con lo que el consumo de oxígeno global por unidad de volumen del reactor se ve incrementado. Por otro lado, al operar con elevadas edades del fango, el sistema tiene la posibilidad de nitrificar, convirtiendo el amoníaco en nitrato y consumiendo oxígeno adicional.

Como se ha dicho anteriormente, en los BRM sumergidos, el flujo de aireación (caudal de aire por unidad de superficie de membrana) permite una limpieza de la membrana, con lo que se pueden establecer ciertas relaciones entre este flujo de aireación y la PTM.

Al aumentar el caudal de aireación la PTM necesaria para mantener un determinado flujo fijo es menor. Esto se explica por el efecto de limpieza de las burbujas gruesas sobre la superficie de la membrana. Además, se observa que, para un flujo de permeado fijo, la relación entre la PTM y el caudal de aireación es lineal. Es más, se puede comprobar empíricamente que la incidencia de la aireación en la presión transmembranal necesaria para conseguir cierto flujo es más fuerte cuanto mayor es la concentración de SSLM.

Otro aspecto observable es que el efecto de limpieza de la aireación por debajo de las membranas es más significativo cuanto mayor es la concentración de SSLM en el biorreactor. Por este motivo, es importante que en las condiciones de operación se establezca un compromiso entre el coste de aireación y el coste de limpieza y mantenimiento de las membranas.

El crecimiento de la biomasa por cada m³ de agua residual tratada también presenta una relación directa con las variaciones del caudal de aire. Así pues, es posible conseguir una reducción de fango, si se aumenta el aporte de oxígeno permitiendo que los microorganismos puedan oxidar la materia orgánica contenida en el agua residual de manera que utilicen esta materia orgánica para proveerse de la energía necesaria para su mantenimiento básico, en lugar de emplearla para su crecimiento.

La aireación también puede tener repercusiones sobre la viscosidad del fango. El efecto de los esfuerzos tangenciales inducidos sobre el licor de mezcla debidos al arrastre de las burbujas gruesas de aireación pueden modificar su estructura. En general, los esfuerzos tangenciales aumentan la población de microorganismos libres y disminuyen el tamaño del flóculo. Esto se puede observar haciendo un estudio reológico de los fangos de un BRM. A nivel macroscópico también se puede observar que al aumentar los esfuerzos tangenciales, aumentando el flujo turbulento de aireación, la viscosidad del licor de mezcla disminuye.

1.4.9.3 Estrategias de operación

La manera de optimizar el rendimiento de las membranas consiste en trabajar de forma cíclica. Un ciclo se compone de un período de filtración seguido de un período de relajación o un periodo de contralavado, que ayuda a mantener la membrana limpia. Limpiar es absolutamente importante para asegurar un funcionamiento regular del BRM.

- El **período de filtración** es el tiempo durante el cual las membranas se encuentran filtrando de modo ininterrumpido el licor de mezcla. Durante este período, la bomba de extracción de permeado está en funcionamiento.
- El **periodo de relajación** es un intervalo de tiempo durante el cual se detiene la filtración y se dejan las membranas reposar permaneciendo el módulo aireado. Dicha aireación nunca se suspende, de forma que el efecto de limpieza provocado por la turbulencia que ejercen las burbujas es continuo.

La duración del ciclo y de los diferentes períodos se puede variar en función de los requerimientos. Por ejemplo, la duración de un ciclo normal puede ser de diez minutos, de los cuales ocho minutos corresponden a la filtración y los dos restantes a la relajación.

- Después de un determinado número de ciclos normales, se lleva a cabo un **ciclo de contralavado** si por la configuración de la membrana ello es posible. Este consiste en bombear permeado desde el depósito de almacenamiento hacia el lado de la alimentación de las membranas con el fin de eliminar las partículas que obstruyen la superficie activa.
- Aún operando en forma cíclica y satisfaciendo siempre las necesidades de aire, la presión transmembranal (PTM) va aumentando con el tiempo de operación debido a fenómenos de ensuciamiento irreversible. Es entonces cuando se debe proceder a una **limpieza química** de mantenimiento, que consiste en realizar un contralavado con hipoclorito sódico y NaOH.
- Ocasionalmente también se realiza un **contralavado químico** para eliminar posibles incrustaciones o depósitos de cal.
- Por último, cabe indicar que también se puede realizar en caso necesario una **limpieza intensiva** vaciando de fango el tanque de membranas (en caso que estuvieran sumergidas) y llenándolo de agua para a continuación añadir un determinado tiempo el hipoclorito sódico.

1.4.10 MODELO DE LAS RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN EN BRM

El modelo de las resistencias en serie se basa en la ecuación de Darcy (Ec. 1), en la cual el flux de permeado es función de la presión transmembranal y de la resistencia total.

Se han desarrollado muchos modelos matemáticos para describir el fenómeno del ensuciamiento (fouling). La filtración de suspensiones celulares que contienen materias tanto disueltas como en suspensión, es un proceso complejo que ha sido objeto de numerosos proyectos de modelización.

Choi et al. (2005) propusieron un modelo en el que la resistencia de las membranas de UF/MF se expresa como suma de diferentes resistencias en serie:

$$R_T = R_m + R_{pc} + R_{rf} + R_{if} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde la resistencia total corresponde con la suma de la resistencia hidráulica de la membrana (R_m), la resistencia debida a los fenómenos de polarización por concentración (R_{pc}), el ensuciamiento reversible (R_{rf}), formado por partículas unidas

débilmente a la membrana, y el ensuciamiento irreversible (R_{if}), formado por la adsorción, obstrucción de poros y sustancias que se adhieren a la membrana.

Otra expresión para el cálculo de la resistencia total, es la propuesta por T.H. Bae y T.M. Tak (2005) [33], siendo ésta la que se ha utilizado en los ensayos realizados.

$$R_T = R_m + R_f + R_c \quad (Ec. 9)$$

Donde, R_m es la resistencia intrínseca de la membrana (m^{-1}), R_f la resistencia debida a sustancias o partículas coloidales (fouling) (m^{-1}) y R_c la resistencia debida a la capa de torta formada por los sólidos en suspensión (m^{-1}). La determinación de las diferentes resistencias se lleva a cabo de manera experimental, tal y como se explica en el apartado de material y métodos 3.4.

1.5 INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL LICOR DE MEZCLA EN LA OPERACIÓN DE LOS BRM

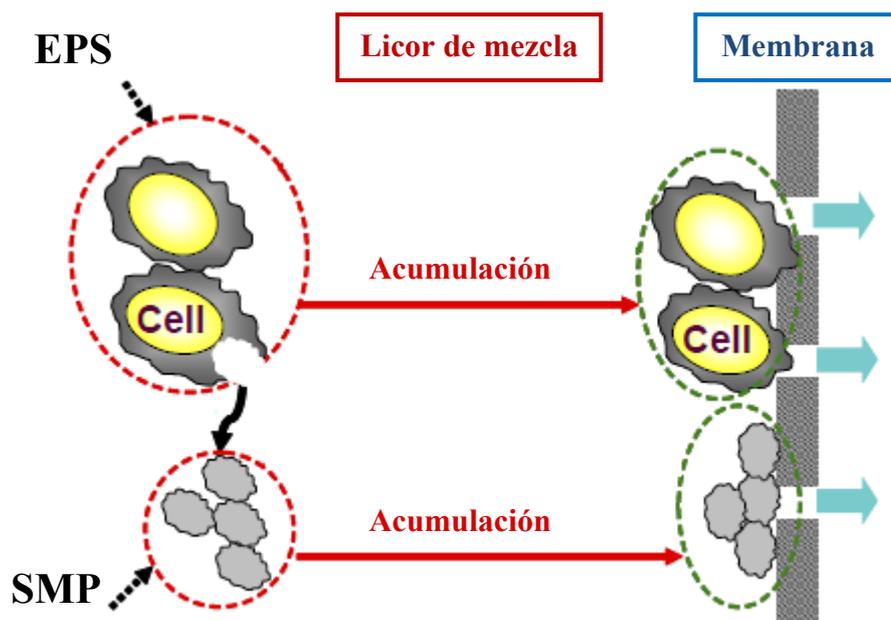
El estudio de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) comenzó hace años pero desde el inicio de la comercialización de los BRM, han aumentado considerablemente las investigaciones que se han centrado en cómo extraer las eEPS de los flóculos y cómo cuantificarlas, ya que son una de las principales causas del ensuciamiento de las membranas, lo que conlleva un coste en limpieza y reposición.

Las EPS están formadas por la suma de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) y los productos solubles microbianos (SMP). Forman parte de la capa exterior de las bacterias presentes en el agua residual y están formadas básicamente por proteínas y polisacáridos aunque también se encuentran en su composición, ácidos nucleicos, lípidos, ácidos húmicos, etc., los cuales pueden estar tanto dentro como fuera de la célula en forma de eEPS o SMP.

Las EPS inicialmente están asociadas a las células, siendo la fracción que se desprende de las mismas los productos solubles microbianos. Ambos se acumulan sobre la superficie de la membrana durante la filtración causando el ensuciamiento de la misma. Su comportamiento sobre la superficie de la membrana y el mecanismo de ensuciamiento de los BRM aún no está resuelto.

En la figura 1.19 se muestra el comportamiento que tienen las EPS en el ensuciamiento de la membrana.

Figura 1.19: Comportamiento de las EPS sobre la membrana



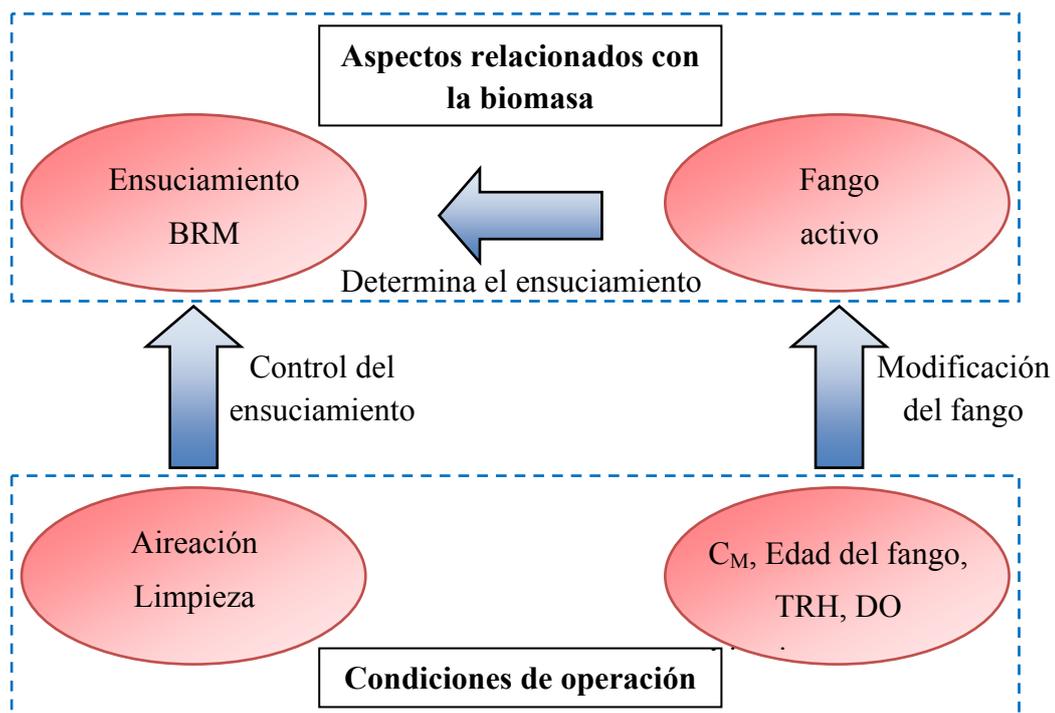
La mayoría de autores (Meng et al.) han identificado las EPS como uno de los factores biológicos más importantes causantes del fouling, en cambio hay otros que afirman que influyen más los SMP (Rushing et al., Rosenberg et al.).

Mezger et al. realizaron un estudio de caracterización de los biopolímeros depositados sobre la membrana de un BRM. Tras una filtración fraccionaron las capas de ensuciamiento en capa superior, capa intermedia y capa inferior mediante enjuague, contralavado y limpieza química. Los resultados mostraron que la capa superior de ensuciamiento era una capa porosa, débilmente unida a la torta y con una composición similar a la de los flóculos. La capa intermedia estaba formada igualmente por SMPs y por agregados bacterianos y tenía una elevada concentración de polisacáridos. La capa inferior representaba la fracción de ensuciamiento irreversible y tenía una elevada concentración de proteínas.

Ahmed et al. afirman que las EPS, tanto las extraídas como las solubles, son el principal causante del ensuciamiento de las membranas en los BRM. Estos autores comprobaron que a medida que aumenta la concentración de EPS, aumenta la resistencia específica de la torta, lo que resulta en una reducción de flujo de permeado y un aumento de la presión transmembranal.

Además, los parámetros de operación como la edad del fango (θ), la carga másica (C_M), el tiempo de retención hidráulico (TRH) y la demanda de oxígeno (DO) no tienen ningún efecto directo sobre el ensuciamiento de la membrana pero determinan las características del fango y como consecuencia, su variación puede modificar el fango activo (Fig. 1.20).

Figura 1.20: Esquema de los factores que afectan al ensuciamiento y los métodos de control



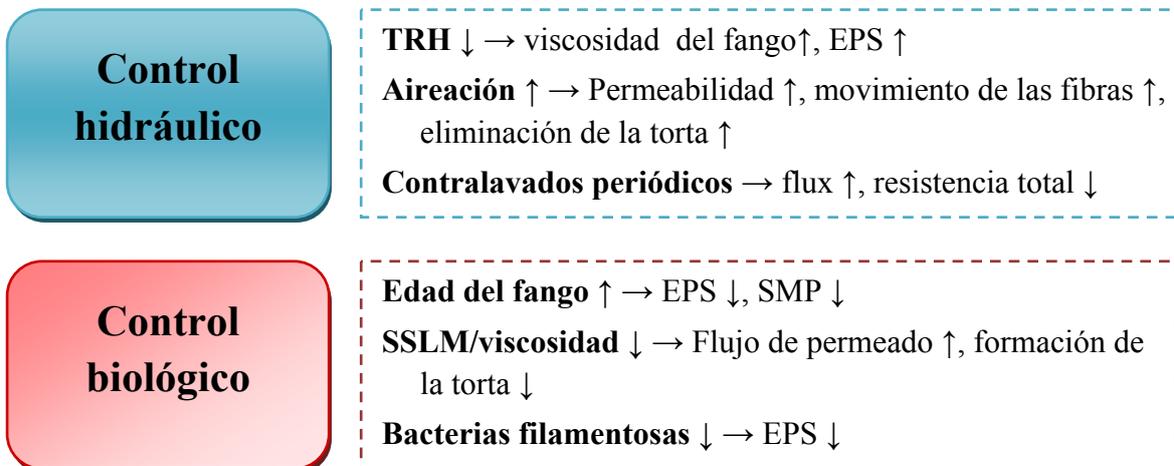
La mayoría de los estudios recientes se centran en encontrar los parámetros de operación adecuados para modificar el fango. Según Cho et al. la edad del fango es uno de los parámetros de operación más importantes que afectan el BRM, una disminución del mismo hace aumentar la cantidad de EPS en los flóculos a una concentración de SSLM de 5000 mg/L. Otros autores hacen la misma afirmación, así por ejemplo, Mase et al. comprobaron que al aumentar la edad del fango de 10 a 53 días, la concentración de EPS disminuía de 45 - 70 mg/gSSV a 20 - 40 mg/gSSV. Por lo que se concluye que edades del fango demasiado cortas pueden dañar la membrana, pero si se llegan a alcanzar edades muy elevadas también pueden causar un ensuciamiento excesivo, siendo la edad del fango óptima para el buen funcionamiento del BRM entre 20 – 50 d, dependiendo del tiempo de retención hidráulico y de las características de la alimentación. El TRH y la carga orgánica son los principales parámetros de funcionamiento que afectan a la producción de EPS ya que rigen el crecimiento y la destrucción de la biomasa. Además, el TRH puede regir tanto la carga másica como la concentración de SSLM.

La intensidad de la aireación, el oxígeno disuelto y el tipo de alimentación también son parámetros importantes que afectan a las EPS. Las EPS mantienen los flóculos más unidos a la membrana, dificultando la eliminación de la torta depositada mediante la turbulencia creada con la aireación. Un aumento de la aireación excesivo puede provocar una disminución de la relación proteína/carbohidrato de los flóculos (Ji y Zhou).

También se están realizando estudios en los últimos años que indican que el bulking filamentoso tiene una gran influencia en el ensuciamiento del BRM, ya que hace aumentar la concentración de EPS.

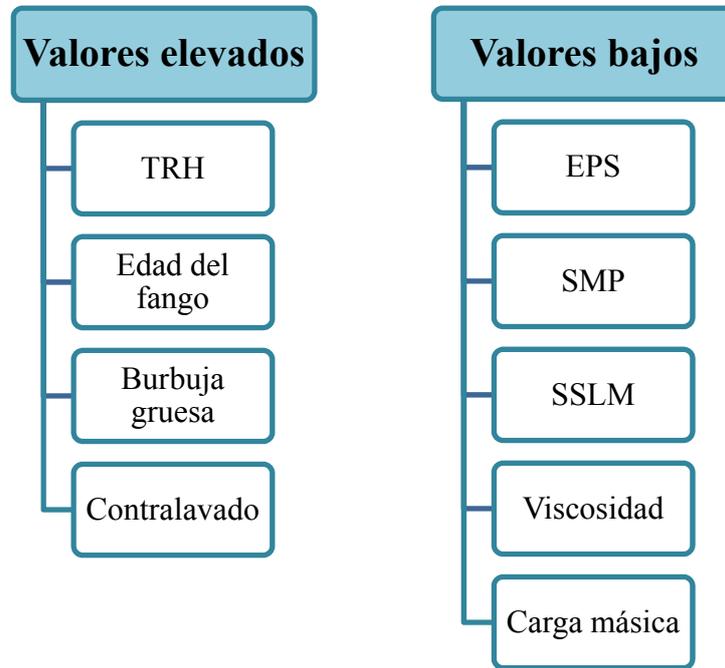
En la figura 1.21 se muestra un esquema de las estrategias de control del ensuciamiento.

Figura 1.21: Efecto sobre el ensuciamiento de la membrana de diferentes parámetros



En la figura 1.22 se muestra a modo de resumen las condiciones favorables que atenúan el ensuciamiento de la membrana.

Figura 1.22: Esquema de las condiciones de operación óptimas de un BRM



Por todo ello, es importante tener establecido un protocolo de caracterización química del licor de mezcla para determinar los valores de eEPS y SMP contenidos y determinar su influencia en el ensuciamiento de las membranas, evaluada mediante las resistencias a la filtración.

2. OBJETIVO

El **principal objetivo** del presente proyecto es el desarrollo de un protocolo de caracterización del licor de mezcla de un biorreactor de membranas que permita relacionar las características químicas del fango con las resistencias a la filtración.

Los **objetivos específicos** a llevar a cabo son:

- Estudio de diferentes procesos de extracción de EPS contenidas en el licor de mezcla de un BRM (métodos de extracción físicos, químicos y combinados).
- Estudio de la agresividad del proceso de extracción mediante análisis de la concentración de ADN.
- Caracterización química del licor de mezcla. Incluirá la determinación de las concentraciones de proteínas y carbohidratos a través de diferentes técnicas analíticas antes y después del proceso de extracción.
- Estudio de la existencia de interferencias entre métodos de extracción y métodos analíticos.
- Correlación de las EPS determinadas con las resistencias a la filtración utilizando una membrana de ultrafiltración.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el siguiente apartado se describen los análisis realizados al licor del fango del BRM, así como los equipos y el material empleado para desarrollar la parte experimental.

Los análisis se van a dividir en diferentes partes: toma de muestras, análisis previos al licor de mezcla, caracterización química del mismo (proceso de extracción de EPS y análisis de los productos solubles microbianos y sustancias poliméricas extracelulares) y caracterización física (ensayo de resistencias a la filtración).

En total se han sometido a análisis un total de veintitrés muestras, las trece primeras de una depuradora que contaba con BRM y línea convencional, de las cuales se muestran seis análisis del BRM (los cuatro primeros no se muestran porque se estaba profundizando en la aplicación de los protocolos de extracción y análisis) y tres del convencional. Y las diez últimas de otra depuradora con BRM.

3.1 TOMA DE MUESTRAS Y CONSERVACIÓN

Inicialmente se pensó en comparar fango de un biorreactor de membranas con fango de un proceso convencional, ya que la depuradora contaba con las dos líneas que funcionaban en paralelo. Sin embargo, debido a problemas de funcionamiento que aparecieron en la línea de tratamiento convencional se optó por analizar únicamente las muestras de licor de mezcla del BRM.

Si bien, se realizaron algunos ensayos con ambos fangos tal y como se muestran en el apartado de resultados 4.1.4.

El primer estudio que se realizó consistió en realizar un estudio de conservación de las muestras. Para ello, una misma muestra fue transportada de tres modos diferentes:

- Muestra enfriada en una nevera portátil (~4°C)
- Muestra aireada a temperatura ambiente
- Muestra mantenida a temperatura ambiente

Se consideró que este análisis previo era necesario para ver cómo se comportaban los eEPS y SMP al variar las condiciones de recepción de la muestra.

Desde la recepción de la muestra en el laboratorio y durante la realización de las extracciones siempre se ha mantenido el fango a una temperatura de 4°C, independientemente del proceso de extracción escogido.

3.2 ANÁLISIS PREVIOS AL LICOR DE MEZCLA

En primer lugar se miden los sólidos en suspensión totales (SSLM) y los sólidos en suspensión volátiles en el licor de mezcla (SSVLM), ya que son datos de partida fundamentales para realizar el proceso de extracción de las eEPS.

También es necesario conocer la macroscopía del flóculo midiendo la V_{30} , así como la microscopía del flóculo observándolo en un microscopio óptico. El tiempo de succión capilar se analiza para evaluar la filtrabilidad del licor de mezcla.

3.2.1 SSLM y SSVLM

- **Sólidos en suspensión totales en el licor de mezcla (SSLM)**

La medida de sólidos se realiza de acuerdo con las normas UNE 77030:02 y UNE 77034:02. Este parámetro mide la cantidad de sólidos que son no filtrables, es decir, aquellos con un tamaño superior a $0,45 \mu\text{m}$ y que por tanto no pasan a través de un filtro de dicho diámetro de poro. Su valor vendrá expresado en mg/L. Los equipos y material empleados para su determinación (Fig 3.1 - 3.2) se enumeran a continuación:

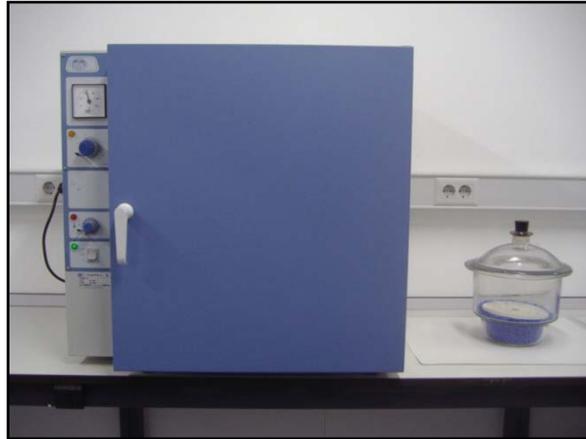
Figura 3.1: Rampa de filtración



- Filtros de membrana de nitrato de celulosa. Ref. ALBET-NCS-045-047 ($\phi_{\text{filtro}} = 47\text{mm}$; $\phi_{\text{poro}} = 45 \mu\text{m}$).
- Balanza analítica Mettler, modelo AE-240.
- Bomba de vacío DINKO, $2,4 \text{ m}^3/\text{h}$.
- Matraz de filtración de 1 L.
- Embudos de filtración de acero inoxidable.
- Desecador de vidrio de 25 cm.
- Pipeta de 25 ml y propipeta.

- Estufa SELECTA, con un rango de temperaturas de 0 a 250°C.

Figura 3.2: Estufa SELECTA y desecador



Modo de operación:

- Se introduce el filtro en el horno a una temperatura de 105°C durante una hora.
- A continuación, se introduce el filtro en el desecador y posteriormente se pesa en la balanza previamente calibrada (P_0).
- Se acopla el filtro en el equipo de filtración y se hacen pasar a través de él 25 ml de muestra.
- Una vez filtrado, se vuelve a introducir el filtro en el horno durante otra hora a 105°C.
- Finalmente, se coloca en el desecador para que no absorba humedad durante media hora y se pesa de nuevo (P_1).

El contenido de sólidos en suspensión de la muestra se determina por diferencia de pesada entre el filtro con el filtrado seco y el filtro vacío, dividiéndolo por el volumen de muestra tal y como se muestra en la ecuación 10:

$$SS \text{ (mg/L)} = \frac{P_1 - P_0}{V} \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde:

P_0 = peso del filtro expresado en mg

P_1 = peso del filtro más el residuo expresado en mg

V = volumen de muestra filtrado expresado en L

- **Sólidos en suspensión volátiles en el licor de mezcla (SSVLM)**

Los sólidos volátiles, también denominados orgánicos, son aquellos que se volatilizan cuando se someten a temperaturas de 550°C en la mufla.

Los equipos y material necesarios para llevar a cabo este ensayo son:

- Mufla SELECTA (Fig 3.3), con un rango de temperaturas de 0 a 600°C.

Figura 3.3: Mufla



- Balanza analítica Mettler, mod. AE-240.
- Desecador de vidrio de 25 cm.
- Crisoles

Modo de operación:

- Se pesa un crisol vacío.
- Se introduce el crisol con el filtro conteniendo los SST en la mufla a una temperatura de 550°C durante una hora. Se evaporará toda la fracción volátil de la muestra.
- A continuación, se introduce el crisol, junto con el filtro, en el desecador durante al menos media hora para que se enfríe sin absorber humedad.
- Se pesa de nuevo el crisol con el filtro (P_2).

La diferencia de pesada entre el crisol antes de entrar en la mufla y después nos da el valor de los sólidos no volátiles, es decir, aquellos que se quedan en el filtro, por lo tanto el valor de los sólidos volátiles se calcularán como se muestra a continuación (Ec. 11 y 12):

$$SSV \left(\frac{mg}{L} \right) = SST \left(\frac{mg}{L} \right) - SSNV \left(\frac{mg}{L} \right) \quad (Ec. 11)$$

Siendo:

$$SSNV \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{P_2 - P_0}{V} \quad (Ec. 12)$$

Donde:

P_0 = peso del filtro expresado en mg

P_2 = peso del filtro con materia no volátil, al salir de la mufla, expresado en mg

V = volumen de muestra en L

3.2.2 SEDIMENTABILIDAD DEL FANGO (V_{30})

La V_{30} mide la sedimentabilidad del fango. Consiste en medir el volumen decantado de 1 L de licor de mezcla al cabo de 5, 10 y 30 minutos. Se realiza en una probeta graduada, dejando la muestra en reposo (Fig. 3.4). Al finalizar este período de tiempo, se registra el volumen ocupado por los fangos que han decantado expresado en mL/L.

Figura 3.4: Ensayo de la V_{30}



3.2.3 TIEMPO DE SUCCIÓN CAPILAR (TSC)

El tiempo de succión capilar (TSC) es una forma rápida y sencilla de evaluar la aptitud para la deshidratación de lodos mediante filtración, por lo que ha sido ampliamente usado para estudiar las propiedades coloidales de las suspensiones.

El fundamento del método se basa en que la deshidratación se alcanza mediante la succión aplicada al lodo por la acción capilar de un papel de filtro absorbente. Una parte de la superficie del papel absorbente se expone al lodo, mientras que el resto permanece libre para absorber el filtrado. La velocidad a la que el papel se humedece con el filtrado es una medida correlacionada con la aptitud para la deshidratación del fango. Se mide a través del tiempo empleado por el filtrado en recorrer la distancia entre dos circunferencias que detectan el avance del líquido sobre el papel.

La figura 3.5 muestra el equipo utilizado para la determinación del TSC de la marca Triton Electronics.

Figura 3.5: Equipo de medida del TSC



Procedimiento de medida:

- 1) Colocar el papel de filtro absorbente en la parte superior del soporte del cabezal de ensayo, y el bloque que contiene las probetas o sondas de acero inoxidable en él, con el lado de la probeta mirando hacia abajo, sobre la parte superior del papel de filtro.
- 2) Se usa un embudo de diámetro de apertura de 1 cm, para filtrado rápido, o un embudo de 1.8 cm de diámetro de apertura, para filtrado lento. Insertar el embudo apropiado en el cabezal de ensayo, y rotar el embudo mientras se aplica una ligera presión hacia abajo en esta posición, para asegurar un contacto parejo con el papel de filtro.
- 3) Poner el instrumento en “On”. Se escuchará un corto sonido “beep”.
- 4) Usando una jeringa, se vierte la muestra de fango dentro del embudo. Los líquidos de la muestra son absorbidos por el papel de filtro, en una trayectoria circular de diámetro creciente. Cuando el frente del líquido alcanza el primer par de sensores (situados en la primera circunferencia), suena el “beep” característico y comienza el conteo del tiempo de succión capilar. Cuando el frente del líquido alcanza el tercer sensor (situado en la segunda circunferencia), el conteo de tiempo se detiene; la luz de terminación comenzará a realizar flashes y se escucha un segundo sonido “beep”. Se anota la lectura del conteo (tiempo de succión capilar) en segundos y décimas de segundos.
- 5) Por último se retira cuidadosamente la parte superior del cabezal de ensayo, y luego el embudo. Es importante limpiar cuidadosamente con un paño el cabezal de ensayo y el embudo de apertura. Cualquier humedad remanente en el cabezal de ensayo o en el embudo podría producir lecturas imprecisas.

Se deben realizar tres medidas por muestra y realizar un promedio. La medida debe descartarse si difiere más del 20% del valor medio calculado.

La temperatura es un factor que afecta significativamente a las medidas. Su influencia puede corregirse por medio de la viscosidad a través de la ecuación 13:

$$TSC_1 = \frac{\mu_1}{\mu_2} \cdot TSC_2 \quad (Ec. 13)$$

3.2.4 ANÁLISIS AL MICROSCOPIO ÓPTICO

El sistema de depuración de aguas residuales por fangos activos supone el desarrollo microbiológico capaz de degradar y flocular la materia orgánica presente en el agua. La estabilidad de esta población depende de las condiciones ambientales y de operación.

El control de la microfauna en los fangos activos aporta una información de las condiciones de funcionamiento del proceso de depuración. Sabiendo la abundancia y tipo de los microorganismos se puede evaluar el grado de depuración y la calidad del efluente, previniendo la aparición de problemas.

Para ello se ha utilizado el microscopio de la figura 3.6 modelo BK1000 de la marca COIC, se trata de un microscopio binocular con revólver cuádruple.

Figura 3.6: Microscopio óptico



Las muestras de licor de mezcla se examinaron el mismo día de su toma de muestra para que no se produjeran variaciones significativas en la biomasa.

Para observar cada muestra al microscopio, se coloca una cantidad homogénea en un vaso de precipitados y se agita con suavidad para no provocar alteraciones en la estructura macroflocular del fango activo. Se toman 25 μL con un micropipeta y se depositan sobre un portaobjetos colocando un cubre encima.

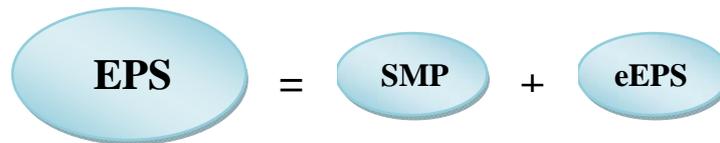
A continuación se coloca el portaobjetos en el microscopio y se examina, utilizando los diferentes objetivos 10x, 40x, 100x y 400x, las características morfológicas del flóculo y la tipología de microorganismos presentes en la biomasa. El procedimiento seguido ha sido realizar un barrido de izquierda a derecha y de arriba abajo con el fin de cubrir la totalidad de la muestra.

3.3. PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE EPS

3.3.1. INTRODUCCIÓN

Las sustancias poliméricas extracelulares (Fig. 3.7) son la suma de los productos microbianos solubles (SMP) y de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS), siendo estas la suma de las sustancias poliméricas extraídas en las diferentes etapas de extracción (eEPS 1 + eEPS 2). Ambos están formados por la suma de proteínas y carbohidratos.

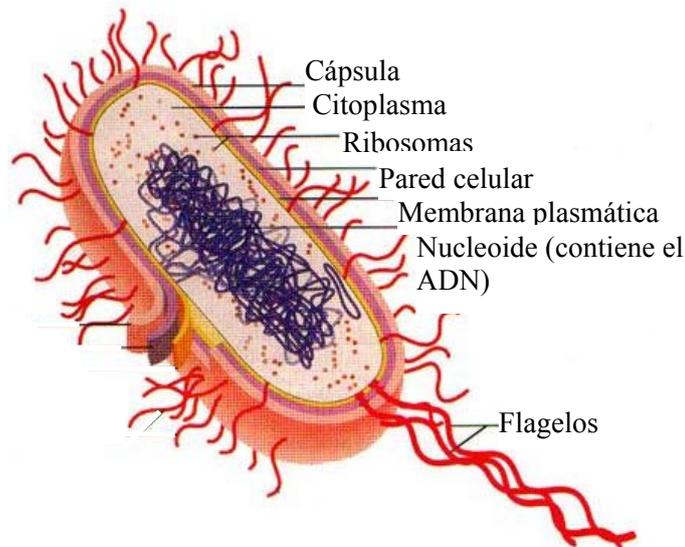
Figura 3.7: Composición de las EPS



Los productos microbianos solubles se encuentran en el sobrenadante del licor de mezcla y con una centrifugación se separan fácilmente, en cambio, las eEPS se obtienen tras someter el fango a un proceso de extracción. La extracción debe ser moderada, ya que si ésta es muy agresiva puede llegar a producirse la ruptura de la membrana celular extrayéndose, además de proteínas y carbohidratos externos, ADN, ácidos húmicos y ácido urónico que interferirán en las medidas de proteínas y carbohidratos.

Las células que mayoritariamente se encuentran en un fango activo son células procarionas. En la figura 3.8 se muestra el esquema de una célula de este tipo con sus partes principales.

Figura 3.8: Esquema de una célula procarionta



Las proteínas se encuentran por toda la célula formando parte de las estructuras celulares y de las enzimas. Los flagelos son una estructura relacionada con la movilidad. Los ácidos nucleicos (ADN) se encuentran en el nucleoide y el ARN en el citoplasma y

en los ribosomas. Los polisacáridos aparecen en la pared celular y, en ocasiones, en gránulos de reserva internos. Los lípidos se localizan en la membrana citoplasmática, la pared celular y en gránulos de reserva.

Existen diferentes métodos de extracción de las sustancias poliméricas extracelulares, los cuales pueden ser químicos, físicos o combinados. A continuación se enumeran los métodos más destacados que se pueden utilizar.

Métodos químicos:

- Resina de intercambio catiónico
- Triton X-100
- Fenol
- EDTA
- Formaldehido
- Formaldehido + NaOH

Métodos físicos:

- Homogeneizador
- Ultrasonidos
- Calentando a 80°C

Métodos combinados:

- Formaldehido + NaOH + ultrasonidos
- Homogeneizador + CER

Frolund et al. (1995) estudiaron la extracción de EPS mediante resina CER, llegando a probar tiempos de extracción de 0,5 a 17 h y velocidades de agitación de 100 a 1100 rpm. Después de 9 h de extracción entre el 60-70% de las células habían sufrido lisis. Concluyeron que el tiempo de extracción más adecuado para una extracción suave era de 0,5 a 1 h y la velocidad de agitación óptima de 600 rpm. En cambio, para una extracción más efectiva utilizaban una extracción de 12h a 900 rpm.

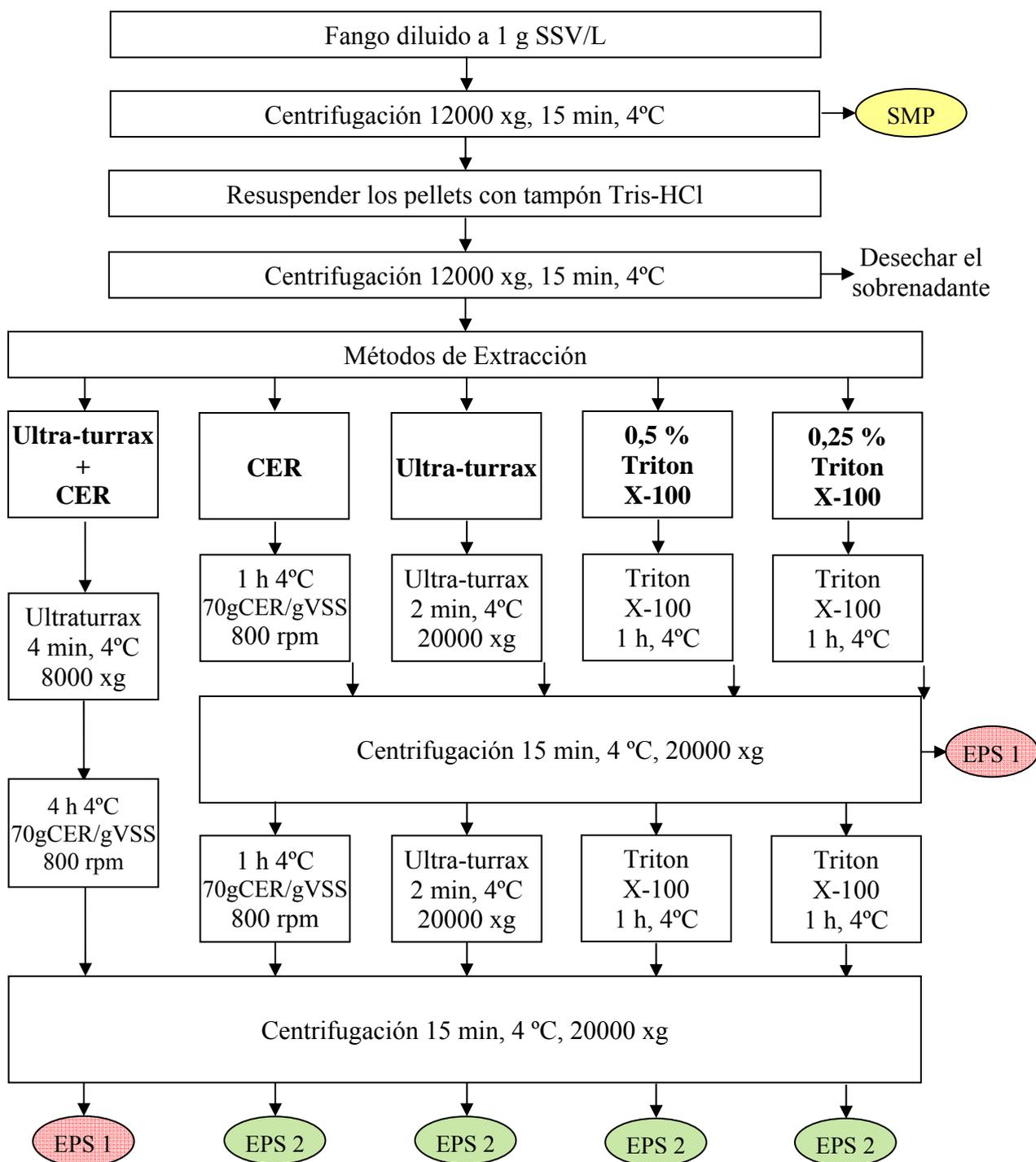
Ras et al. (2008) investigaron la eficiencia de diferentes protocolos de extracción (mecánicos y químicos) de EPS, obteniendo que la eficiencia del método aumentaba al repetir el mismo proceso o aplicando un tratamiento mecánico previo. Los procedimientos con Triton X-100 0,5% (Triton/Triton, o Ultraturax/Triton) fueron los que mayor cantidad de proteínas extraían comparados con CER, el homogeneizador y la combinación de estos.

Liu et al. (2002) comparan la extracción de EPS de diferentes fangos utilizando varios métodos de extracción: EDTA, resina catiónica CER y Formaldehido con y sin NaOH, siendo la extracción con Formaldehido (fija la célula impidiendo la ruptura celular) y NaOH (aumenta el pH aumentando la solubilidad de las EPS, favoreciendo que se extraigan mayor cantidad) la más efectiva, ya que la extracción realizada con CER fue una extracción suave de 1h a 600 rpm y no extrajo casi proteínas.

En la presente tesis de máster se ha trabajado con la resina de intercambio catiónico Dowex Marathon C, con el detergente Triton X-100 (a dos concentraciones 0,5% y 0,25%), con el homogeneizador Ultra-Turrax, combinando la resina de intercambio iónico con el Ultraturrax y repitiendo el mismo proceso dos veces, tal y como se muestra en la figura 3.9 a modo de resumen.

También se han probado diferentes tiempos de duración de la extracción con resina CER.

Figura 3.9: Esquema de los protocolos de extracción de las EPS



3.3.2. PROCEDIMIENTOS

En los procesos de extracción se ha trabajado con el fango diluido a una concentración de 1 gSSV/L para evitar interferencias de sustancias que pueda contener el fango y además para que las comparaciones entre muestras puedan ser más representativas. La única excepción ha sido el método Ultra-Turrax + CER en el que se ha trabajado con el fango sin diluir. A la hora de realizar los cálculos, se debe tener en cuenta el factor de dilución aplicado para determinar el contenido real de proteínas o carbohidratos en la muestra.

MÉTODO CER EN 2 ETAPAS

Material y reactivos:

- Centrífuga refrigerada
- Tubos de centrífuga de PC de 30 mL de Nalgene
- Vasos de precipitados
- Erlenmeyers de 250 mL
- Matraz de 200 mL
- Placa agitadora + Imanes
- Vórtex
- Cristalizadores
- Papel de aluminio
- Bolsas de hielo
- Resina CER DOWEX Marathon C (Sigma Aldrich, Ref: Fluka 91973)
- Tampón Tris-HCl 10 mmol/l, pH = 8
- Filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 μm

Procedimiento:

- 1) Se prepara la resina: se pesan aprox. 28 g de resina CER DOWEX, (aproximadamente porque luego se lavará y pesará más), se le adicionan 100 mL de tampón Tris-HCl y se deja en agitación durante **1h** tapada con papel de aluminio para mantener en la oscuridad. Posteriormente se filtrará con papel de filtro.
- 2) Se diluye la muestra de fango a una concentración de 1 gSSV/L para evitar interferencias con los ácidos húmicos (WR 42, 2008).
- 3) Se centrifuga la disolución a 12000 $\times g$ y 4°C durante 15 min (PROG 1). En la figura 3.10 se muestra la centrífuga utilizada en el laboratorio.
- 4) Se separa el sobrenadante, ya que contiene los productos microbianos solubles → **SMP** (previamente se filtra con la jeringa para eliminar posibles partículas

que puedan interferir en el análisis de la muestra). Se almacena en el congelador a -20°C .

Figura 3.10: Centrífuga refrigerada y separación de fases tras centrifugación



En la figura 3.11, se muestra un tubo de centrifuga con el pellet separado del sobrenadante.

Figura 3.11: Separación de fases tras la centrifugación



- 5) Se juntan los pellets restantes, se añade tampón Tris-HCl y se homogeneizan con el vórtex. De esta forma, se elimina de los pellets posibles restos de SMP.
- 6) Se centrifuga (PROG 1).
- 7) Se desecha el sobrenadante.
- 8) Se redisuelven los pellets con Tris-HCl, volviendo al volumen de partida para mantener la misma concentración de SSV.
- 9) Se pesa la cantidad necesaria de resina preparada anteriormente (paso 1). La relación resina CER/SSV es 35 g CER/0,5 g SSV.

$$0,2 \text{ g SSV} \rightarrow 14 \text{ g resina CER}$$

Por lo tanto, se toman 2 erlenmeyers (para las 2 etapas) y se pesan 14 g de resina filtrada en cada uno.

- 10)** Se añade al primero de los erlenmeyers la disolución anterior y se deja en agitación con hielo durante **1h a 800 rpm y 4°C**. En la figura 3.12 se observa cómo se realiza el proceso de extracción con la resina.

Figura 3.12: Proceso de extracción de eEPS mediante resina CER



- 11)** Transcurrida la hora se centrifuga el contenido del erlenmeyer (PROG 1).
- 12)** Se guarda el sobrenadante a -20°C , contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas \rightarrow **eEPS 1** (previamente se filtra con filtro de jeringa para eliminar partículas).

En la figura 3.13 se muestra el tipo de filtro de jeringa utilizado (acetato de celulosa de $0,45\ \mu\text{m}$) y los tubos en los que se almacena el extracto obtenido.

Figura 3.13: Filtración del extracto previo al almacenamiento



- 13)** Se juntan los pellets anteriores disolviéndolos con Tris-HCl y se enrasan en el matraz aforado.

- 14) A continuación, se añade el contenido del matraz anterior en el segundo erlenmeyer (del paso 9) que contiene la resina.
- 15) Se deja en agitación con hielo durante **1h a 800 rpm y 4°C**.
- 16) Se centrifuga el contenido del erlenmeyer (PROG 1).
- 17) Se guarda el sobrenadante a -20°C, contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas en la segunda extracción → **eEPS 2** (se filtra con filtro de jeringa para eliminar partículas).

En la figura 3.14, se observa el extracto obtenido tras las dos extracciones.

Figura 3.14: Muestras a analizar tras las extracciones



Las sustancias poliméricas extracelulares eEPS totales serán la suma de las extraídas en ambas etapas eEPS 1 + eEPS 2.

MÉTODO HOMOGENEIZADOR + CER (Wingender et al. 1999)

Material y reactivos:

- Centrífuga refrigerada
- Homogeneizador Ultra-Turrax
- Tubos de centrifuga de PC
- Vasos de precipitados
- Erlenmeyers de 250 mL
- Matraz aforado de 200 mL
- Placa agitadora + Imanes
- Agitador vórtex
- Cristalizadores
- Papel de aluminio
- Bolsas de hielo

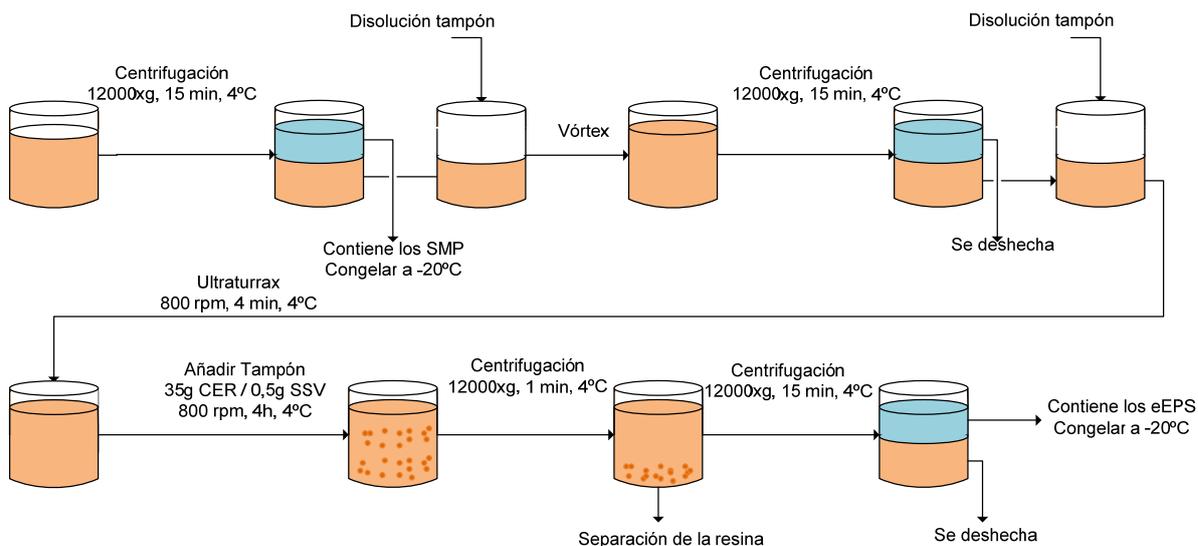
- Resina CER DOWEX Marathon C (Sigma Aldrich)
- Tampón Tris-HCl 10 mmol/l, pH = 8
- Filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 μm

Procedimiento:

- 1) Se prepara la resina: para ello se pesan aprox. 35 g de resina CER DOWEX, (se pesa aproximadamente porque luego se lavará y pesará más), se le adiciona tampón Tris-HCl y se deja en agitación durante **1h** tapada con papel de aluminio para mantener en la oscuridad. Posteriormente se filtra con papel de filtro, mantener siempre el mismo tiempo de filtrado para que no hayan variaciones entre muestras.
- 2) Se introduce en los erlenmeyers la cantidad necesaria de resina y el agitador.
- 3) Se calcula el volumen de fango a analizar a partir de los SSVLM.
- 4) Se distribuye la muestra del licor del fango anterior en diferentes tubos de centrífuga.
- 5) Se centrifuga a 12000 xg y 4°C durante 15 min (PROG 1).
- 6) Se separa el sobrenadante, ya que contiene los productos microbianos solubles → **SMP** (se filtra con la jeringa para eliminar posibles partículas). Se almacena en el congelador a -20°C.
- 7) Se juntan los pellets restantes, se añade tampón Tris-HCl y se homogeneizan con el vórtex. De esta forma, se elimina de los pellets posibles restos de SMP.
- 8) Se centrifuga (PROG 1).
- 9) Se desecha el sobrenadante.
- 10) Se redisuelven los pellets con Tris-HCl en el vórtex.
- 11) Se junta la biomasa anterior en un mismo tubo y se coloca en el homogeneizador Ultra-Turrax 4 min a 8000 rpm. Se ha de mantener la muestra en hielo durante el proceso.
- 12) Se vierte la biomasa homogeneizada en uno de los erlenmeyers que contiene la resina (preparado en el aptdo. 2).
- 13) Se colocan los erlenmeyers en los cristalizadores rodeados de hielo y se colocan en la base agitadora. Se agita durante **4 horas a 4° C y 800 rpm**.
- 14) Se centrifuga el contenido del erlenmeyer (**PROG 1**).
- 15) Se guarda el sobrenadante a -20°C, contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas → **eEPS** (se filtra con filtro de jeringa para eliminar partículas).

A modo de resumen del proceso de extracción se presenta el esquema de la figura 3.15.

Figura 3.15: Extracción de eEPS por el método CER



MÉTODO TRITON X-100

El método con Triton X-100 se realizó a dos concentraciones distintas. En primer lugar al 0,5% y como aparecieron interferencias a la hora de analizar el extracto con el método de Lowry (proteínas) y con el método de la antrona (carbohidratos), se trabajó a una concentración de 0,25% para ver si se eliminaban las interferencias.

El procedimiento experimental seguido es el mismo en ambos casos, sólo difiere la cantidad de Triton X-100.

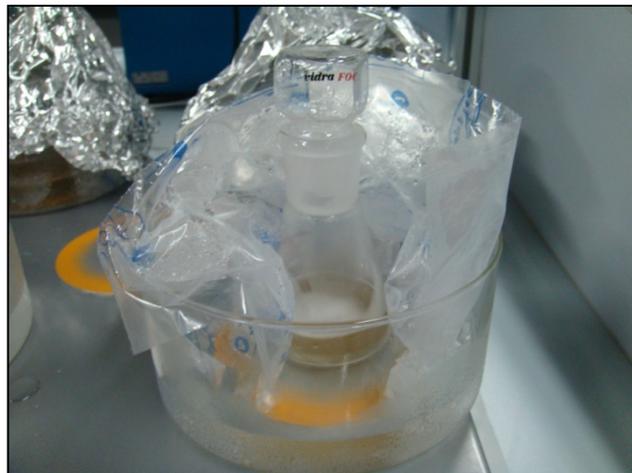
Material y reactivos:

- Centrífuga refrigerada
- Tubos de centrífuga de PC de 30 mL de Nalgene
- Vasos de precipitados
- Erlenmeyers de 100 mL
- Matraz de 50 mL
- Placa agitadora + Imanes
- Vórtex
- Cristalizadores
- Papel de aluminio
- Bolsas de hielo
- Triton X-100 (Panreac)
- Tampón Tris-HCl 10 mmol/l, pH = 8
- Filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 μm

Procedimiento:

- 1) Se prepara un volumen de fango diluido a una concentración 1gSSV/L.
- 2) Se centrifuga la disolución preparada a 12000 xg y 4°C durante 15 min (PROG 1).
- 3) Se separa el sobrenadante contiene los productos microbianos solubles → **SMP** (filtrar con la jeringa para eliminar posibles partículas). Se almacena en el congelador a -20°C.
- 4) Se juntan los pellets restantes en tubos de centrifuga, se añade tampón Tris-HCl y se homogeneizan con el vórtex. De esta forma, se elimina de los pellets posibles restos de SMP.
- 5) Se centrifuga (PROG 1).
- 6) Se desecha el sobrenadante.
- 7) Se redisuelven los pellets con Tris-HCl, volviendo al volumen de partida, para mantener la misma concentración de SSV.
- 8) Se tara un erlenmeyer y se pesa la cantidad de Triton necesaria.
- 9) Se añade al erlenmeyer que contiene el Triton la disolución del matraz aforado, (preparado en el paso 7).
- 10) Se deja en agitación con hielo durante **1h a 500 rpm y 4°C** (Fig. 3.16).
En la figura 3.16 se muestra el proceso de extracción con Triton X-100.

Figura 3.16: Proceso de extracción de eEPS mediante Triton X-100



- 11) Transcurrida la hora se centrifuga el contenido del erlenmeyer (PROG 1).
- 12) Se guarda el sobrenadante a -20°C, contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas → **eEPS 1** (se filtra con un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 μm).
- 13) Se juntan los pellets anteriores, se disuelven con Tris-HCl y se vuelve al matraz aforado.

- 14) En un segundo erlenmeyer se pesa la misma cantidad de Triton que anteriormente y se añade el contenido del matraz.
- 15) Se dejar en agitación con hielo durante **1h** a **500 rpm** y **4°C**.
- 16) Se centrifuga el contenido del erlenmeyer (**PROG 1**).
- 17) Se guarda el sobrenadante a **-20°C**, contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas en la segunda extracción → **eEPS 2**.

Tal y como se muestra en la figura 3.17, en la primera extracción se obtiene mayor concentración de proteínas y carbohidratos que en la segunda, ya que se observa una muestra más coloreada.

Figura 3.17: Muestras obtenidas tras las extracciones



Las sustancias poliméricas extracelulares eEPS totales serán la suma de las extraídas en ambas etapas eEPS 1 + eEPS 2.

MÉTODO CON EL HOMOGENEIZADOR

Material y reactivos:

- Centrifuga refrigerada
- Homogeneizador Ultra-Turrax
- Tubos de centrifuga
- Tubos de 50 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Agitador vórtex
- Bolsas de hielo
- Vaso de precipitados de 1000 mL
- Tampón Tris-HCl 10 mmol/l, pH = 8
- Filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 µm

Procedimiento:

- 1) Se preparan un volumen de fango diluido a una concentración 1gSSV/L.
- 2) Se centrifuga a 12000 xg y 4°C durante 15 min (PROG 1).
- 3) Se separa el sobrenadante que contiene los productos microbianos solubles → **SMP** (se filtra con un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 µm). Se almacena a -20°C.
- 4) Se juntan los pellets en tubos de centrifuga, se añade tampón Tris-HCl y se agitan en el vórtex. De esta forma, se elimina de los pellets posibles restos de SMP.
- 5) Se centrifuga (PROG 1).
- 6) Se desecha el sobrenadante.
- 7) Se redisuelven los pellets con Tris-HCl, volviéndose al volumen de partida, para mantener la misma concentración de SSV (1 gSSV/l).
- 8) Se divide el volumen del matraz en tubos de 50 mL.
- 9) Se ponen sucesivamente los tubos en el homogeneizador Ultra-Turrax rodeándolos con hielo durante **2 min a 20000 xg y 4°C**.

En la figura 3.18 se muestra el material empleado en este método.

Figura 3.18: Homogeneizador Ultra-Turrax y material empleado en la extracción



- 10) Se centrifuga el contenido de los 3 tubos (PROG 1).
- 11) Se guarda el sobrenadante a -20°C, ya que contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas → **eEPS 1** (se filtra con la jeringa 0,45 µm para evitar la presencia de sólidos en suspensión que puedan interferir en los métodos analíticos).
- 12) Se juntan los pellets disolviéndolos con Tris-HCl y volver al matraz de partida.

- 13) Se divide el volumen del matraz en tubos de 50 mL.
- 14) Se ponen sucesivamente los tubos en el Ultra-Turrax con hielo durante **2 min a 20000 xg y 4°C**.
- 15) Se centrifuga el contenido de los 3 tubos (PROG 1).
- 16) Se guarda el sobrenadante a -20°C, contiene los → **eEPS 2**. (se filtra con la jeringa 0,45 µm).

Las sustancias poliméricas extracelulares eEPS totales serán la suma de las extraídas en ambas etapas eEPS 1 + eEPS 2.

3.4 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL LICOR DE MEZCLA

3.4.1 MÉTODO DE ADICIÓN ESTÁNDAR

Los análisis de los extractos (eEPS) se han realizado por tres vías distintas para dar mayor certeza a los datos obtenidos:

- Análisis del 100 % de la muestra: es decir, tomando el volumen necesario para el análisis de proteínas o carbohidratos de muestra extraída directamente. Se realiza por triplicado.
- Análisis del 50% de la muestra, es decir diluyéndola a la mitad con tampón Tris-HCl. Se ha de tener en cuenta que el resultado se deberá de multiplicar por dos.
- Adición estándar, la cual se explica a continuación.

Este método se utiliza para comprobar si existen interferencias entre la muestra y el método analítico, lo que se conoce como la recta de adición estándar. Consiste en construir una recta de calibrado sobre la propia muestra desconocida. Para ello se toman tres o más alícuotas de muestra y se les añaden diferentes concentraciones de estándares perfectamente conocidas.

- 1) Establecer las concentraciones de patrón a añadir a la muestra, de modo que esté dentro de la recta de calibrado. Por ejemplo pueden ser las siguientes:

$$C_{\text{patrón}} \text{ (mg/l)} \quad 0 \quad 50 \quad 100 \quad 200$$

- 2) Fijar un volumen de muestra, tal que, en función del volumen total, dará un factor de dilución.

$$f_{\text{Dilución}} = \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{alícuota}}}$$

- 3) Preparar una disolución madre partiendo de BSA o glucosa, en función de si se analizan proteínas o carbohidratos.
- 4) En función de la concentración de la disolución antes preparada y del volumen total de muestra que se quiera tener se calcula el volumen de cada patrón.
- 5) El volumen de Tris-HCl se calcula por diferencia.

En la tabla 3.1 se muestra un ejemplo de los volúmenes que se deberían tomar para la aplicación de método de adición estándar para analizar las proteínas por el método BCA, el cual se describe en el punto 3.3.2.

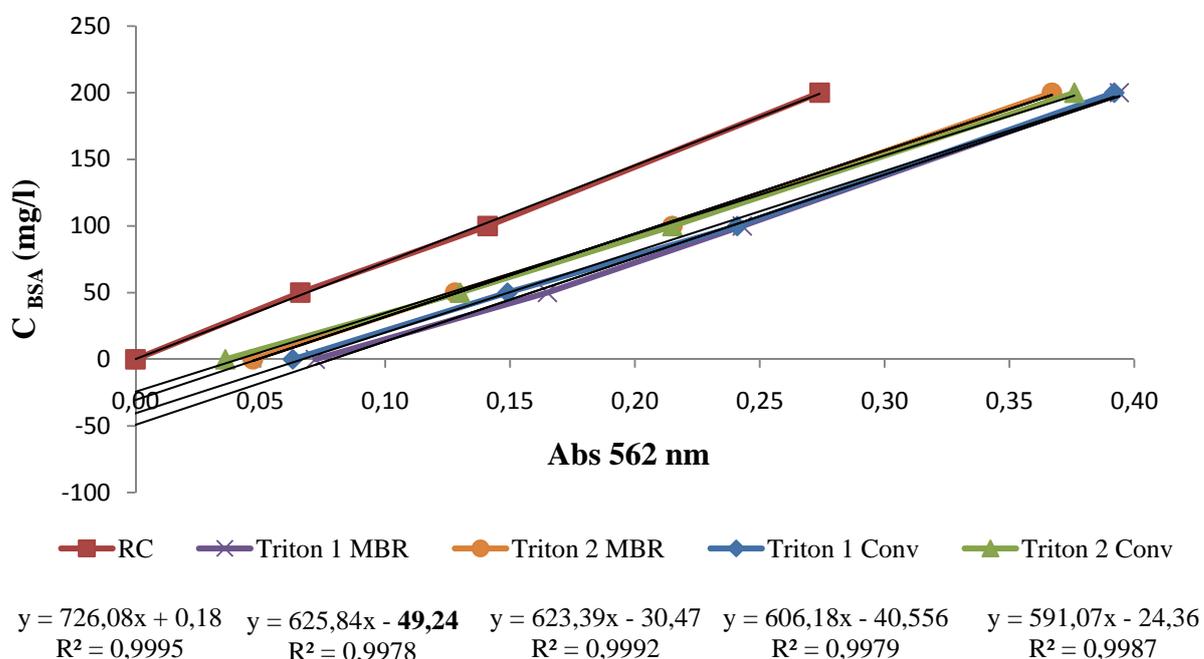
Tabla 3.1: Adición estándar MÉTODO BCA

$C_{\text{patrón}}$ (mg/l)	0	50	100	200
V_{muestra} (μl)	1000	1000	1000	1000
$V_{\text{patrón}}$ (μl)	0	250	500	1000
$V_{\text{Tris-HCl}}$ (μl)	1000	750	500	0
V_{TOTAL} (μl)	2000	2000	2000	2000

6) Representar gráficamente la absorbancia (medida a 562 nm) frente a la concentración de BSA y ver si la recta de la adición estándar es paralela o no a la recta de calibrado (RC).

- Si ambas rectas son paralelas significa que no hay interferencia entre la muestra y el método analítico.
- Si las rectas intersectan en la zona positiva del gráfico la interferencia será restrictiva, es decir, se detecta menos color y por tanto menos concentración de proteínas o carbohidratos.
- Si intersectan en la zona negativa, la interferencia será aditiva, es decir, la concentración obtenida es mayor de la real.

Gráfico 3.1: Adición estándar: Método BCA



En el gráfico 3.1, se observa la representación de las rectas de adición estándar y la recta de calibrado para el caso de una muestra de fango de BRM y otra de fango de convencional sometida a un proceso de extracción con Triton X-100.

Las rectas obtenidas con la adición estándar son paralelas a la recta de calibrado, lo que indicaría que no existe interferencia entre el método analítico y las muestras de fango analizadas. El desplazamiento horizontal de las rectas desde la ordenada en el origen indica las distintas concentraciones de BSA para cada muestra.

Este método se aplica tanto a las muestras sometidas a procesos de extracción (eEPS) como a la fracción soluble de las mismas (SMP). En el primer caso, el método detectaría la existencia de interferencias entre el método analítico y el método de extracción y en el segundo caso, la existencia de interferencias entre el método analítico y los componentes del fango.

- 7) Una vez realizada la representación, el valor de la concentración de proteína con adición estándar se calcula multiplicando el valor de la ordenada en el origen en valor absoluto por el factor de dilución utilizado en el método y por el factor de dilución utilizado en el caso de que se haya trabajado con una muestra diluida.

En la tabla 3.2 se demuestra que, para este caso, los valores obtenidos con adición estándar no difieren significativamente de los obtenidos con la muestra diluida al 50% (mitad de muestra y mitad de tampón Tris-HCl) y los de la muestra analizada sin dilución (100%), es decir, el V_{TOTAL} corresponde íntegramente a la muestra y se mide directamente sobre la recta de calibrado.

Tabla 3.2: Comparación de resultados por los tres métodos realizados

		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	mg eq BSA/g SSV
MBR	Triton 1	757,902	807,480	798,575	159,420
	Triton 2	468,994	528,115	401,877	
CONV	Triton 1	152,468	172,686	160,501	129,820
	Triton 2	91,594	98,982	94,077	

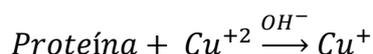
3.4.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Método BCA

Fundamento:

Este método se emplea para determinar muestras con concentración de proteína entre 20-2000 µg/ml. Es un método colorimétrico basado en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV.

El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^+ en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.



El método tiene pocas interferencias y es insensible a detergentes como el Triton X-100 hasta concentraciones del 5%.

Material:

- Micropipeta de 10 a 100 µl y micropipeta de 100 a 1000 µl con sus puntas.
- Eppendorfs de 1 ml.
- Agitador vórtex.
- Base agitadora magnética e imán.
- Baño termostataado a 37° C.
- Porta eppendorfs.
- H₂O ultrapura
- Disolución tampón Tris-HCl 10mmol/l.
- Kit BCA, de Novagen:
 - 3 x 1 ml BSA Standard (2 mg/ml)
 - Disolución BCA 500 ml
 - 15 ml sulfato cúprico al 4%
- Espectrofotómetro y cubetas.

Procedimiento:

- 1) Se enumeran los eppendorfs.

- 2) Se enciende el espectrofotómetro 15 ó 20 minutos antes de empezar a trabajar con él para que se vayan calentando las lámparas.
- 3) Se preparan las muestras para realizar la recta de calibrado. Se realizará el método “Enhanced Assay” del kit de BCA Novagen (tabla 3.3), el cual estudia los puntos entre 0 y 250 µg/ml de proteína BSA.

Tabla 3.3: Recta de calibrado 0-250 µg/ml de proteína BSA para método BCA

MÉTODO BCA (Enhanced assay)				
Nº Muestra	C_{BSA} (µg/ml)	V_{BSA} (µl)	V_{H2O} (µl)	V_{TOTAL} (µl)
1	250	125	875	1000
2	125	62,5	937,5	1000
3	50	25	975	1000
4	25	12,5	987,5	1000
5	5	2,5	997,5	1000
6	0	0	1000	1000

En el caso que se quieran preparar rectas de calibrado hasta valores de mayor concentración, se puede utilizar la tabla 3.4:

Tabla 3.4: Recta de calibrado 0-1000 µg/ml por dilución de proteína BSA para método BCA

MÉTODO BCA (Standard assay)				
Nº Muestra	C_{BSA} (µg/ml)	V_{BSA} (µl)	V_{H2O} (µl)	V_{TOTAL} (µl)
1	1000	250 de BSA Standard	250	500
2	500	250 de la muestra 1	250	500
3	250	250 de la muestra 2	250	500
4	125	300 de la muestra 3	300	600
5	25	100 de la muestra 4	400	500
6	0	0	400	400

- 4) Se prepara “BCA Working Reagent”: se mezcla **10 ml solución BCA + 200 µL disolución sulfato cúprico 4%** y se agita con el agitador magnético.
- 5) Se pipetea **50 µL** de cada estándar preparado (para la recta de calibrado) y/o muestra a analizar en los eppendorfs previamente marcados.

Como se ha comentado anteriormente de cada muestra se analizarán los eEPS y SMP por triplicado para asegurar resultados repetitivos.

- 6) Se añade **1 ml** de “BCA Working Reagent” a los eppendorfs anteriores y se agitan en el vórtex. En la figura 3.19 se muestra el material necesario para este análisis.

Figura 3.19: Material empleado



7) Se introducen los eppendorfs en el baño a **37°C** durante **30 minutos** (Fig. 3.20).

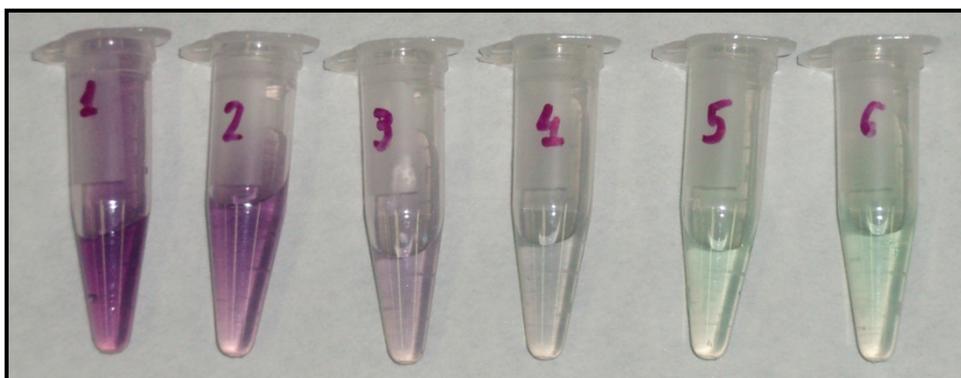
Figura 3.20: Baño a 37° C con los eppendorfs



8) Se extraen los eppendorfs del baño y se enfrían a temperatura ambiente. A continuación, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro.

En la figura 3.21 se observa como las muestras de mayor concentración de proteína presentan un color violeta más intenso.

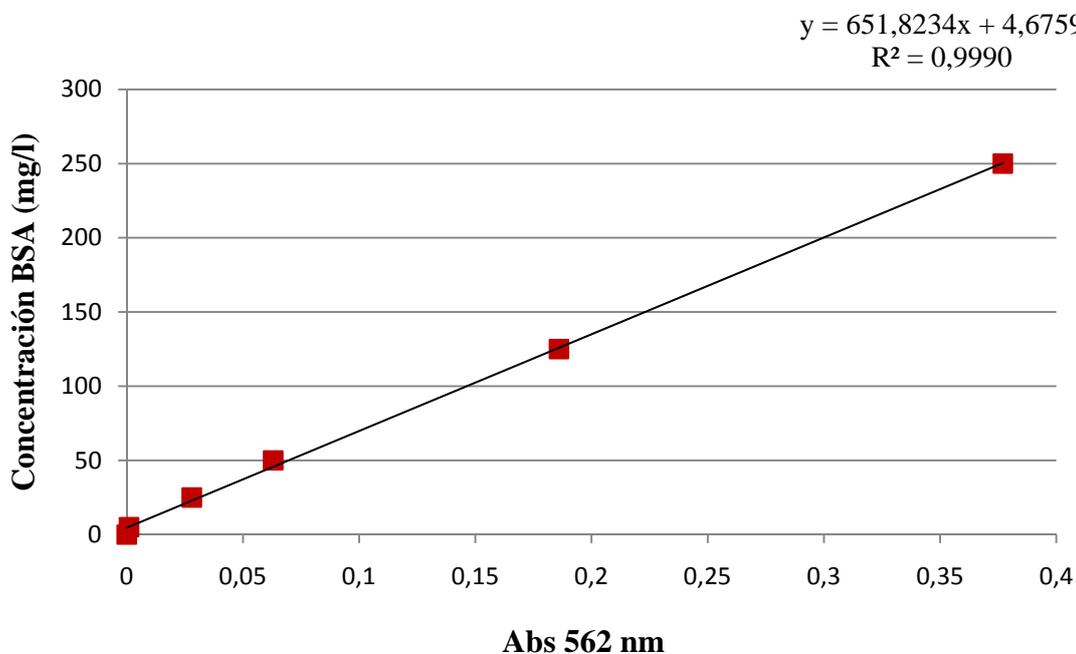
Figura 3.21: Aspecto de las muestras de la recta de calibrado a la salida del baño



- 9) Se lee la absorbancia a $\lambda = 562 \text{ nm}$. Las medidas se deben hacer rápidamente porque las muestras cambian de color con el tiempo.

En el gráfico 3.2 se representa la recta de calibrado obtenida:

Gráfico 3.2: Recta de calibrado Método BCA



Método MICRO BCA

Fundamento:

Este método se emplea para determinar proteínas a nivel de micro escala, es decir, para muestras con concentración de proteína entre 0,5-20 $\mu\text{g/ml}$.

El ensayo se basa en la reducción de los iones Cu^{2+} por la proteína (igual que el método BCA). De este modo, el Cu^+ formado se detecta por conversión a una sustancia de color violeta por reacción con el bicinoninato.

A 562 nm la absorbancia del complejo $\text{Cu(I)-(bicinoninato)}_2$ es proporcional a la concentración de proteína.

El método tiene pocas interferencias y es insensible a detergentes como el Triton X-100 hasta concentraciones del 5%.

Material:

- Micropipeta de 10 a 100 μl y micropipeta de 100 a 1000 μl con sus respectivas puntas.

- Eppendorfs de 2 ml.
- Base agitadora magnética e imán para homogenizar el “BCA Working Reagent”.
- Baño termostático a 60° C.
- Porta eppendorfs.
- Soporte para introducir los eppendorfs en el baño.
- H₂O ultrapura.
- Disolución tampón Tris-HCl 10mmol/l.
- Kit Micro BCA, de Applichem.
 - Reactivo A
 - Reactivo B
 - Reactivo C
- Espectrofotómetro y cubetas.

Procedimiento:

- 1) Se enumeran los eppendorfs.
- 2) Se pipetea **1 ml** de cada disolución para la recta de calibrado o muestra, más el blanco.

Para la preparación de la recta de calibrado se utilizan los valores mostrados en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Recta de calibrado 0-20 µg/ml de proteína BSA

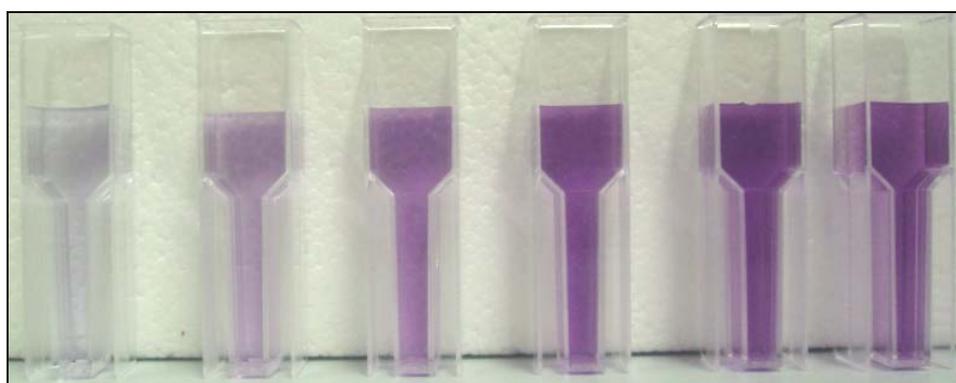
MÉTODO MICRO BCA				
Nº Muestra	C_{BSA} (µg/ml)	V_{BSA} (µl)	V_{TRIS-HCl} (µl)	V_{TOTAL} (µl)
1	25	18,75	1481,25	1500
2	20	15	1485	1500
3	15	11,25	1488,75	1500
4	10	7,5	1492,5	1500
5	5	3,75	1496,25	1500
6	0	0	1500	1500

- 3) Se prepara el “Working Reagent”. Para un volumen de 50 ml:
 - 25 ml Reactivo A
 - 24 ml Reactivo B
 - 1 ml Reactivo C
- 4) Se pipetea **1 ml** de “Working Reagent” en cada eppendorf.

- 5) Se agita con el vórtex.
- 6) Se introduce en el baño a **60°** durante **1h**.
- 7) Se deja enfriar hasta temperatura ambiente.
- 8) Se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a **562 nm**. Las medidas se deben hacer rápidamente porque las muestras cambian de color con el tiempo.

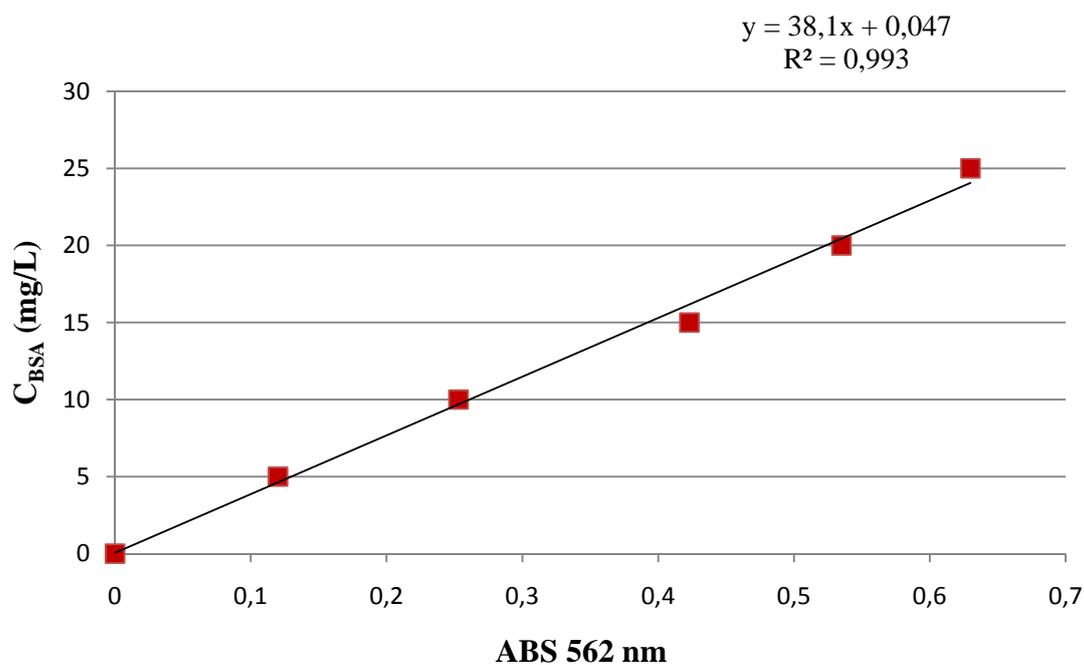
En la figura 3.22 se observa como las muestras de mayor concentración de proteína presentan un color violeta más intenso.

Figura 3.22: Aspecto de las muestras de la recta de calibrado a la salida del baño



En el gráfico 3.3 se muestra la recta de calibrado:

Gráfico 3.3: Recta de calibrado Método Mico BCA



Método de LOWRY

Fundamento:

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico para la valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$. Este método consta de dos etapas:

1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina (los cuales están presentes en la mayoría de las proteínas), el cobre actúa como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Material:

- Micropipetas y puntas de 100 a 1000 μl y de 1000 a 5000 μl .
- Vasos de diferentes tamaños para preparar los 4 reactivos y para las disoluciones de la recta de calibrado.
- Agitador magnético e imanes de varios tamaños.
- Cubetas de kits para cada una de las muestras a analizar y los puntos de la recta de calibrado.
- Agitador vórtex.
- Espectrofotómetro y cubetas.
- Reactivos (Fig. 3.23):

(A) $2\text{g Na}_2\text{CO}_3 + 0,027\text{g tartrato de NaK (4H}_2\text{O)} + 100\text{ ml NaOH (0,1N)}$

(B) $0,5\text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 1\text{ gota H}_2\text{SO}_4\text{ conc.} + 10\text{ ml H}_2\text{O ultrapura}$

(C) $50\text{ ml reactivo (A)} + 1\text{ ml reactivo (B)}$

(D) Disolución acuosa de Folin con dilución 1:2. Para preparar 2 curvas simultáneamente será necesario mezclar 4 ml de Folin y 8 ml de H_2O .

Figura 3.23: Reactivos y disoluciones preparadas



Procedimiento:

- 1) Se enciende el espectrofotómetro.
- 2) Se prepara la recta de calibrado con una disolución BSA estándar con rango de concentraciones entre 0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla. 3.6).

Tabla 3.6: Recta de calibrado 0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína BSA para el método de Lowry

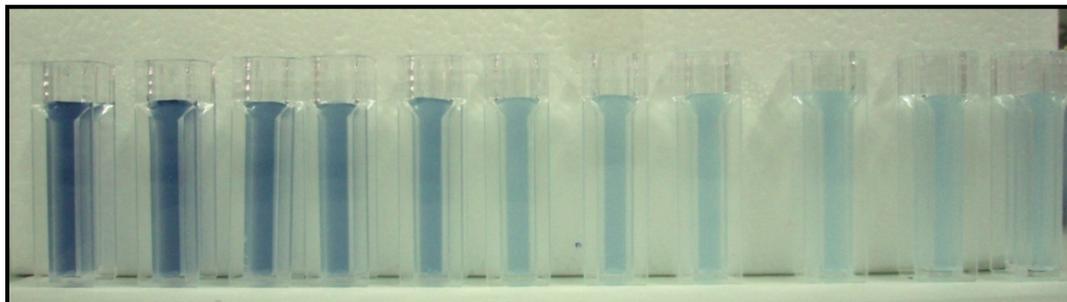
MÉTODO LOWRY				
Nº Muestra	C _{BSA} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	V _{BSA} (μl)	V _{H₂O} (μl)	V _{TOTAL} (μl)
1	200	600	5400	6000
2	150	4500	1500	6000
3	100	4000	2000	6000
4	75	4500	1500	6000
5	50	4000	2000	6000
6	25	3000	3000	6000
7	20	4800	1200	6000
8	10	3000	3000	6000
9	5	3000	3000	6000
10	2	2400	3600	6000
11	0	0	6000	6000

- 3) Se mezclan 1 ml de dilución de la recta de calibrado o muestra + 3 ml reactivo (C) en cubetas-kits.
- 4) Se agita en el vórtex.
- 5) Se deja reaccionar durante 10 minutos.
- 6) Se añaden 0,3 ml de reactivo (D) a cada cubeta.
- 7) Se agita en el vórtex.

- 8) Se deja reaccionar 30 minutos.
- 9) Se mide la absorbancia a $\lambda = 750 \text{ nm}$.

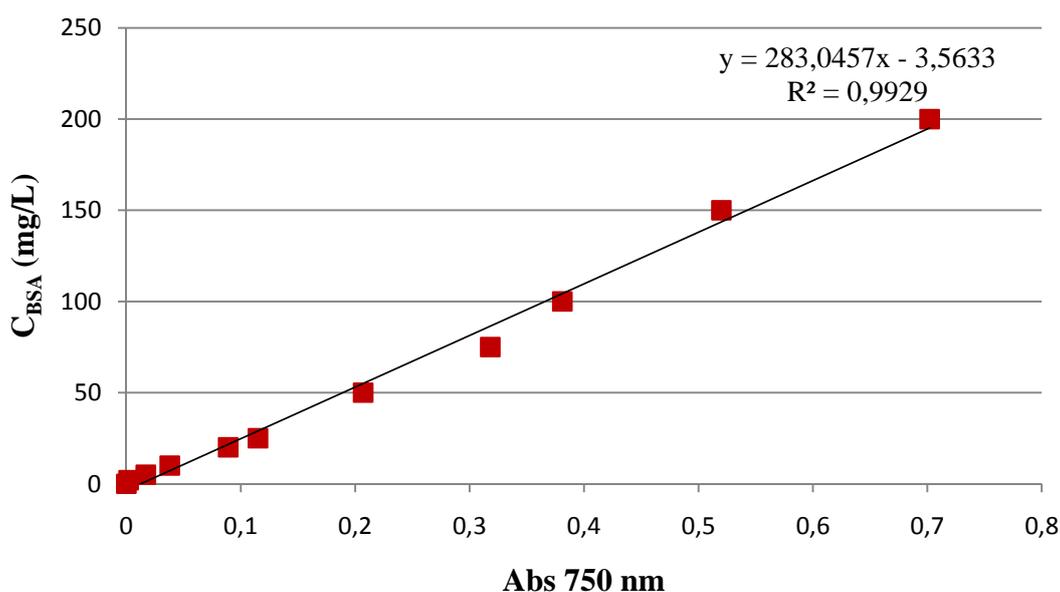
En la figura 3.24 se puede observar el color azulado de los puntos de la recta de calibrado.

Figura 3.24: Cubetas desechables con las diluciones de la recta de calibrado



En el gráfico 3.4 se representa la curva de calibrado obtenida:

Gráfico 3.4: Recta de calibrado Método Lowry



3.4.3 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

Método de la ANTRONA

Fundamento:

La antrona en ácido sulfúrico concentrado reacciona para formar un derivado del furano de color verde con un máximo de absorción en 625 nm. La reacción colorimétrica

cumple con la Ley de Beer y Lambert en el rango de concentración estudiado, entre 10 y 100 mg/l de Glucosa.

La sensibilidad del método es de unos 3 mg/l de Glucosa. La desviación estándar (ds) en el rango estudiado es de 4 mg/l.

La antrona forma un compuesto verde en medio ácido fuerte (Acido sulfúrico) con ciertos carbohidratos y sacáridos, en especial con azúcares y almidones. La reacción de la antrona (9.10 dihydro 9 ketoantraceno) en medio sulfúrico produce un derivado del verde furano que tiene su máximo de absorción en 625 nm.

Material:

- Vasos de precipitados pequeños (20 ml ó 25 ml).
- Base agitadora e imanes pequeños.
- Cubetas-kits para poner 1 ml de cada muestra de la recta de calibrado + 2 ml de la disolución de antrona (2%) en H₂SO₄, para poder agitar en el vórtex. Por cada muestra a analizar se requerirán dos cubetas-kits adicionales.
- Micropipeta de 100 a 1000 µl y micropipeta de 1000 a 5000 µl con sus puntas.
- Matraces aforados de 100 ml y de 50 ml con tapón.
- Vidrio de reloj y embudo.
- Agitador vórtex.
- H₂O ultrapura.
- Material de seguridad: guantes de nitrilo, trabajar en campana extractora.
- Dosificador para el ácido sulfúrico.
- Balanza analítica.
- Espectrofotómetro.
- Baño termostataado a 100° C.
- Cristalizador con hielo.
- Rejilla para las cubetas.
- Soporte para introducir las cubetas en el baño.
- Reactivos:
 - ✓ Ácido sulfúrico concentrado 96 %
 - ✓ D-Glucosa monohidrato PRS 143140.1210
 - ✓ Antrona 1.01468.0010 Merck

Procedimiento:

- 1) Se enciende el espectrofotómetro y el baño.
- 2) Se prepara una disolución de antrona 0,2% en H₂SO₄. Se deja reaccionar durante 2h.

En la figura 3.25 se muestra el material empleado para realizar el análisis de carbohidratos con antrona.

Figura 3.25: Material empleado



- 3) Se construye la recta de calibrado con el compuesto D-Glucosa monohidrato (varios puntos entre 0 y 100 mg/l), (Tabla 3.6).

Tabla 3.6: Recta de calibrado 0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de glucosa para el método de la antrona

MÉTODO ANTRONA				
Nº Muestra	C _{D-Glucosa} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	V _{D-Glucosa} (μl)	V _{H₂O} (μl)	V _{TOTAL} (μl)
1	100	1500	0	1500
2	75	1125	375	1500
3	50	750	750	1500
4	35	525	975	1500
5	25	375	1125	1500
6	10	150	1350	1500
7	0	0	1500	1500

- 4) Se toman 1 ml de cada estándar preparado (para la recta de calibrado) y/o de la muestra a analizar y añadir 2 ml de la disolución de antrona en ácido sulfúrico en las cubetas-kits.
- 5) Se agita en el vórtex.
- 6) Se deja reaccionar 14 minutos en el baño a 100 °C.
- 7) Se enfría durante 5 minutos en un cristalizador con hielo.

En la figura 3.26 se muestra el baño utilizado y el cristalizador para enfriar.

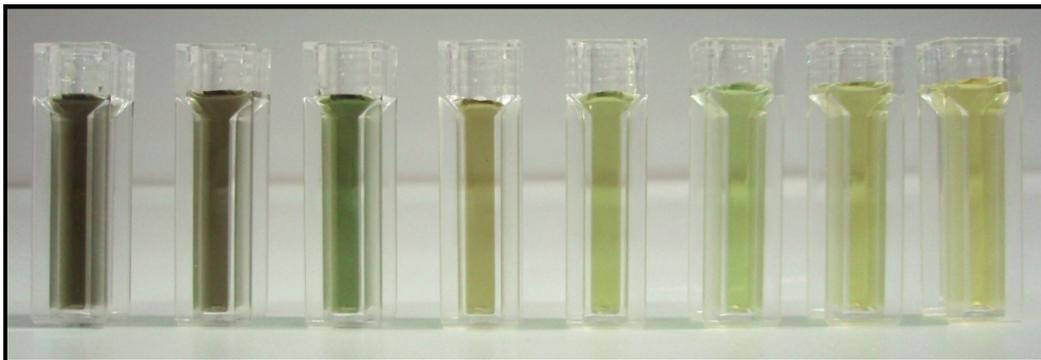
Figura 3.26: Baño a 100° C y baño con hielo



8) Se mide la absorbancia a $\lambda = 625 \text{ nm}$.

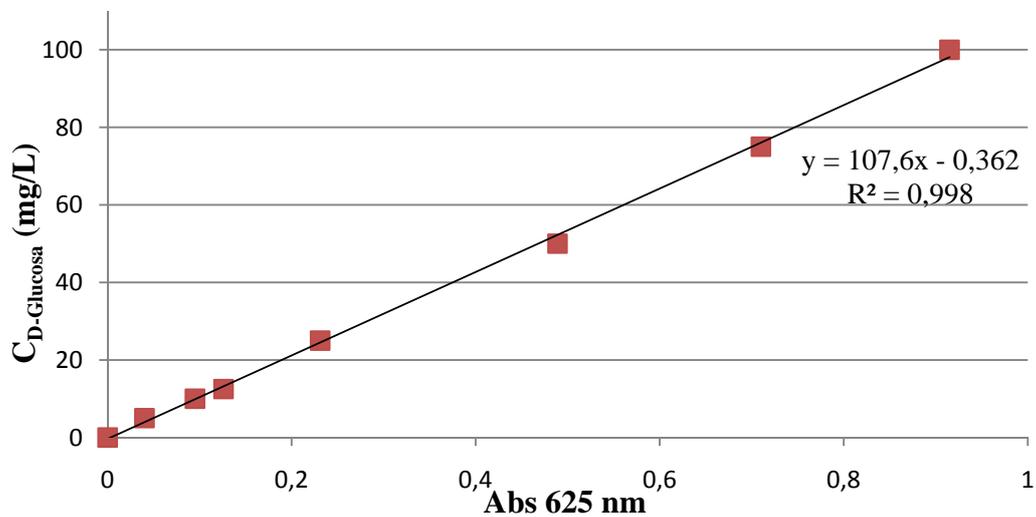
En la figura 3.27 se puede observar el color verdoso de los puntos de la recta de calibrado.

Figura 3.27: Cubetas antes de medir en el espectrofotómetro



En el gráfico 3.5 se representan los puntos de la recta de calibrado.

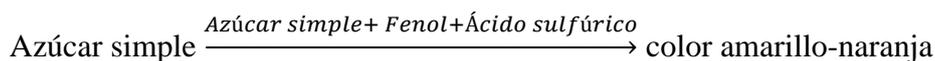
Gráfico 3.5: Recta de calibrado Método Antrona



Método de DUBOIS

Fundamento:

El contenido total de carbohidratos de medios líquidos o extractos puede ser determinado como azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, dando un color naranja muy estable cuando reaccionan en fenol y en presencia de ácido sulfúrico concentrado.



La intensidad de color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes. Esta absorbancia puede ser medida a 490 nm y la concentración total de carbohidratos de las soluciones problema puede ser medida con respecto a una curva estándar preparada.

Material:

- Vasos de precipitados pequeños (20 ml o 25 ml) para preparar las diluciones de la recta de calibrado.
- Agitador magnético e imanes pequeños.
- Cubetas-kits.
- Rejilla para colocar las cubetas.
- Micropipetas y puntas de 100 a 1000 µl y de 1000 a 5000 µl.
- Matraz aforado de 100 ml con tapón.
- Vidrio de reloj y embudo.
- Agitador vórtex.
- H₂O ultrapura.
- Material de seguridad: guantes de nitrilo y máscara. Trabajar en campana extractora, ya que el fenol es tóxico.
- Dosificadores para ácido sulfúrico y disolución de fenol.
- Balanza analítica.
- Espectrofotómetro.
- Reactivos:
 - ✓ Fenol PA 134852.1209, 5%
 - ✓ Ácido sulfúrico concentrado 96 %
 - ✓ D-Glucosa monohidrato PRS 143140.1210
- Envase debidamente etiquetado para depositar los residuos que contengan fenol y el agua de su limpieza para posteriormente gestionarlo.

Procedimiento:

- 1) Encender el espectrofotómetro entre 15 y 20 min antes de su uso.

- 2) Construcción recta de calibrado con el compuesto D-Glucosa monohidrato (varios puntos entre 0 y 200 mg/l, tabla. 3.7 y fig.3.28).

Figura 3.28: Matraz con la muestra patrón y vasos con las diluciones



Tabla 3.7: Recta de calibrado 0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de D-Glucosa para método Dubois

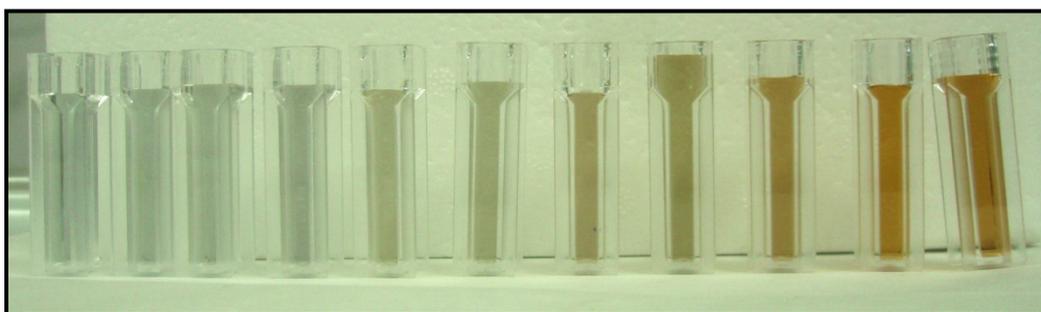
MÉTODO DUBOIS				
Nº Muestra	C _{D-Glucosa} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	V _{D-Glucosa} (μl)	V _{H₂O} (μl)	V _{TOTAL} (μl)
1	200			9000
2	150	6750 de muestra 1	2250	9000
3	100	6000 de muestra 2	3000	9000
4	75	6750 de muestra 3	2250	9000
5	50	6000 de muestra 4	3000	9000
6	25	4500 de muestra 5	4500	9000
7	20	7200 de muestra 6	1800	9000
8	10	4500 de muestra 7	4500	9000
9	5	4500 de muestra 8	4500	9000
10	2	3600 de muestra 9	5400	9000
11	0	0	9000	9000

- 3) Se añade en cada cubeta-kit 1 ml de cada estándar preparado (para la recta de calibrado) y/o de la muestra a analizar, se añade 1 ml de la disolución del fenol con la micropipeta (en campana, uso de guantes y máscara). Las disoluciones más concentradas adquieren un color anaranjado mientras que las más diluidas amarillo.
- 4) A continuación, se añade rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agita en el vórtex.
- 5) Se deja reaccionar la mezcla durante 10 minutos y se vuelve a agitar en el vórtex.

- 6) Se deja reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Se mide la absorbancia a $\lambda = 490 \text{ nm}$.

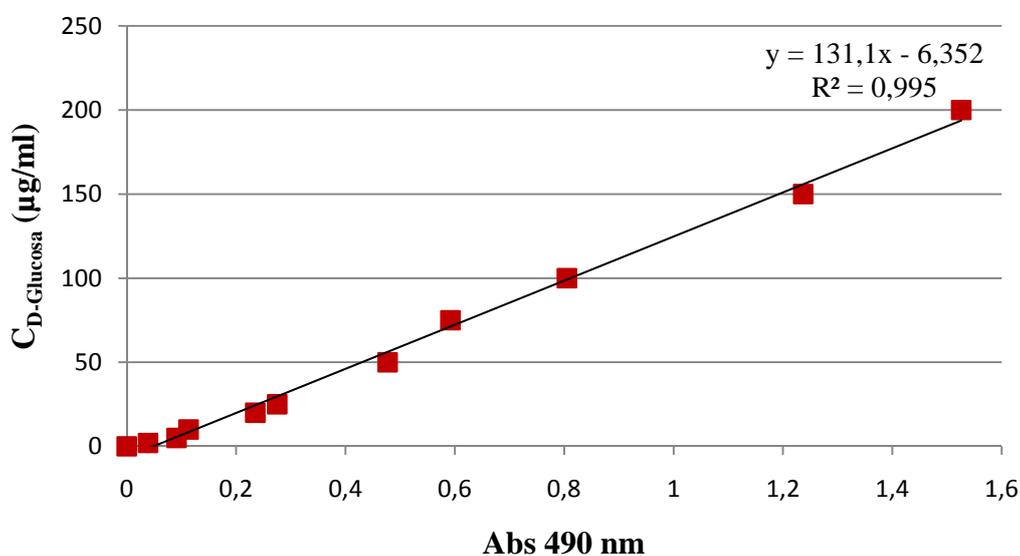
En la figura 3.29 se muestra el color ocre que toman las disoluciones preparadas para la recta de calibrado.

Figura 3.29: Cubetas de poliestireno con las muestras de la recta de calibrado



En el gráfico 3.6, se representa la recta de calibrado obtenida al medir en el espectrofotómetro.

Gráfico 3.6: Recta de calibrado Método Dubois



3.4.4 ANÁLISIS DE ADN

Fundamento:

El ADN se mide para comprobar si la extracción realizada ha sido demasiado agresiva y así poder seleccionar el óptimo método de extracción.

Para su determinación se ha utilizado el fluorómetro Qubit, con sus respectivos kits, los cuales emplean colorantes selectivos que se tornan fluorescentes cuando se unen al ADN, ARN ó proteínas, (en nuestro caso se han utilizado sólo los kits de determinación de ADN). Estos colorantes son específicos para sus *targets* y no se acoplan a contaminantes como fenol, sales, cloroformo y/o nucleótidos libres. El resultado es una lectura de fluorescencia que refleja exactamente la cantidad de producto que se tiene interés en cuantificar.

Es un medición rápida y fácil, obteniéndose la lectura directamente en la pantalla del equipo.

Material:

- Micropipetas y puntas de 0,50 a 10 µl, de 10 a 50 µl y de 100 a 1000 µl.
- Tubos de PRC.
- Eppendorfs de 2 mL.
- Porta eppendorfs.
- Kit de determinación de ADN HS (alta sensibilidad) de rango 0,2-100 ng.
- Kit de determinación de ADN BR (amplio rango) de rango 2-1000 ng.
- Fluorómetro, el cual se muestra en la figura 3.30.

Figura 3.30: Fluorómetro utilizado para la determinación del ADN



Procedimiento:

En función de si se van a analizar muestras con menor o mayor concentración de ADN se emplea un kit u otro, por ejemplo las muestras de SMP como no han sido sometidas a

ningún proceso de extracción se analizan con el rango más sensible, el HS. El procedimiento a seguir es el mismo independientemente del kit seleccionado.

- 1) Se enumeran los tubos de PCR
- 2) Se preparan las dos muestras de estándar que se suministran en el kit para realizar el calibrado del equipo. El primer estándar tiene una concentración de $0\text{ng}/\mu\text{L}$ y el segundo de $100\text{ ng}/\mu\text{L}$. Se toman $10\ \mu\text{L}$ de cada uno y se colocan en un tubo de PCR.
- 3) Se introducen $10\ \mu\text{L}$ de cada muestra en un tubo de PCR.
- 4) Se prepara el “Quant-iT reagent solution” que es el reactivo que se añade a cada muestra y hace que se desarrolle el color que indica la presencia de ADN. Se prepara juntando $10\ \mu\text{L}$ de fluorocromo con $1990\ \mu\text{L}$ del tampón suministrado.
- 5) Se añade a cada muestra $190\ \mu\text{L}$ del “Quant-iT reagent solution” preparado anteriormente.
- 6) Se agitan los tubos en el vórtex.
- 7) Se incuba durante 2 minutos.
- 8) Se mide el valor de ADN en el fluorómetro.

Nota: Al trabajarse con un fluorocromo es conveniente que no se exponga a la luz por lo que se ha de trabajar con la máxima oscuridad posible.

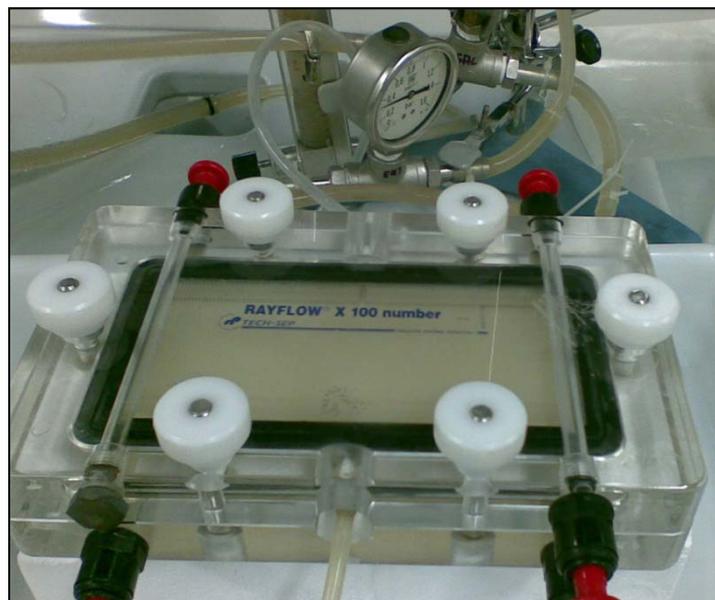
3.5 ENSAYO DE LAS RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN

3.5.1 MÓDULO DE MEMBRANAS

El módulo de filtración Rayflow 100, es un equipo de pequeñas dimensiones, aproximadamente de unos 400 mm² por el que se hace pasar el licor de mezcla procedente de un BRM para determinar la resistencia del mismo a la filtración por membranas. En la figura 3.31 se muestra el módulo utilizado.

El área útil de membrana es de 100 cm².

Figura 3.31: Módulo de filtración Rayflow 100



En la tabla 3.8 se recogen las características del módulo de membranas utilizado.

Tabla 3.8: Características del módulo RayFlow 100

Superficie activa de la membrana	2 x 100 cm ²
Presión de operación	0 – 3 bar
Caudal de alimentación	0 – 500 L/h
Velocidad tangencial	1,7 m/s para 250L/h; 3,5 m/s para 500L/h
Peso	2,5 kg

3.5.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El modelo matemático más utilizado para determinar el ensuciamiento de las membranas es el modelo de resistencias en serie. Según este modelo, la dependencia del caudal de filtración con la presión transmembranal aplicada se expresa a través de una serie de resistencias cuyo cálculo se realiza de forma experimental de acuerdo con el

procedimiento descrito por T.H. Bae y T.M. Tak, (2005) “*Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor*” [33].

Para la determinación de las resistencias a la filtración por membrana se ha utilizado una pequeña planta piloto de laboratorio, la cual se muestra en la figura 3.32. A continuación, se detalla el material del que consta:

- Módulo de membranas de filtración tangencial Rayflow 100 (Fig 3.1).
- Bomba peristáltica de velocidad variable de la marca Masterflex, modelo 7591-07.
- Dos manómetros marca Nuovafima de 0 a 1,6 bar.
- Rotámetro marca Tecfluid de rango 25-250 L/h.
- Válvula para regular la presión.
- Depósito para alimentación de 2 L de capacidad.
- Termómetro para controlar la temperatura de operación.
- Balanza de precisión.
- Cronómetro.
- Probeta de 50 mL.

Figura 3.32: Montaje utilizado para determinar las resistencias a la filtración



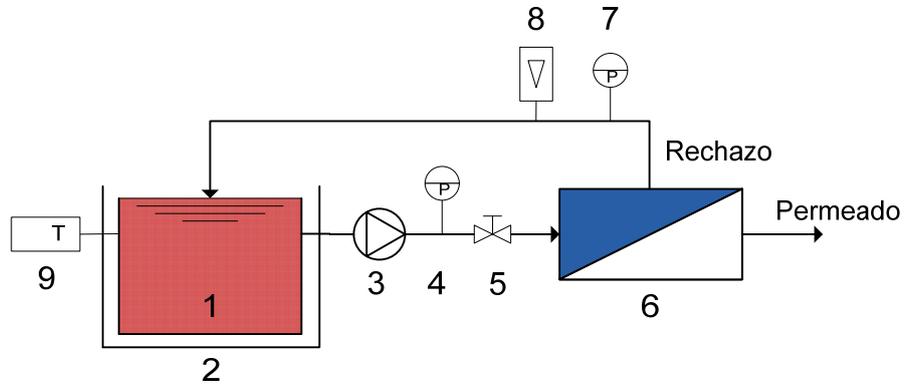
Previamente a poner en funcionamiento la instalación se ha de preparar el recorte de la membrana y colocarlo adecuadamente en el módulo Rayflow.

Para el cálculo de la resistencia total, se ha de calcular la resistencia intrínseca de la membrana (R_m), la resistencia debida a la capa de torta (R_c), formada por la capa que se va depositando sobre la superficie de la membrana y la resistencia causada por la adsorción de soluto en los poros y paredes de la membrana (R_f). La suma de estas tres resistencias (Ec. 14) se define como la resistencia total (R_T) e indica la mayor o menor resistencia que opone el fango a ser filtrado por una membrana.

$$R_T = R_m + R_f + R_c \quad (\text{Ec. 14})$$

En la figura 3.33 se muestra un diagrama de flujo del proceso.

Figura 3.33: Diagrama de flujo del módulo de filtración



A continuación se enumeran los elementos que componen la planta piloto:

1. Tanque de alimentación
2. Baño termostático
3. Bomba peristáltica
4. Manómetro de entrada
5. Válvula reguladora
6. Módulo de membranas
7. Manómetro de salida
8. Rotámetro
9. Termómetro del baño

Los pasos a seguir a nivel experimental son: medida de la permeabilidad al agua destilada, medida del caudal de permeado que ofrece la membrana una vez esté circulando el licor de mezcla, limpieza del sistema con agua de red y medida de la permeabilidad de la membrana después de limpiar con agua destilada.

1) Medida de la permeabilidad al agua destilada para determinar R_m :

- Se llena la jarra de alimentación con agua destilada.
- Se conecta la bomba de alimentación y se establece un caudal de 50 L/h mediante el variador de frecuencia de la bomba.
- Se fija una PTM de 100 mbar por medio de una válvula de estrangulamiento situada en el tubo de permeado.
- Transcurridos 10 minutos (tiempo en el que se considera que se ha alcanzado estado estacionario) se mide el caudal de permeado y se anota el valor obtenido.

- Se repite este procedimiento a 200, 300 y 400 mbar.
- Se representa la curva Q_{permeado} vs PTM y, si se obtiene una recta con un coeficiente de regresión aceptable, se toman los valores correspondientes a la medida de 300 mbar.
- En caso de que la relación obtenida no sea lineal, se debe desestimar el recorte de membrana y cambiarlo por uno nuevo.

R_m se calcula mediante la ecuación 15:

$$R_m = \frac{PTM}{\mu \cdot J_W} \quad (Ec. 15)$$

Donde,

PTM presión transmembranal (mbar)

μ viscosidad del permeado (Pa·s)

J_W flux de permeado empleando agua destilada en el ensayo ($\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)

2) Medida del flujo de permeado del fango, cálculo de R_c :

- Se llena la jarra de alimentación con la muestra de licor de mezcla.
- Se introduce la jarra en un baño térmico para minimizar la influencia de la temperatura ($T \sim 12^\circ$).
- Se conecta la bomba de alimentación y se establece un caudal de 50 L/h.
- Se fija una PTM de 300 mbar por medio de una válvula de estrangulamiento situada en el tubo de permeado.
- El permeado se vierte en un recipiente situado sobre una balanza (previamente tarada) y cada minuto se anota el valor del peso.
- Una vez alcanzado el valor estacionario (cuando los incrementos de masa son constantes, aproximadamente a los 45 minutos de ensayo) se anota el caudal final.

R_c se obtiene mediante la ecuación 16:

$$R_c = \frac{PTM}{\mu \cdot J_{AS}} - R_m - R_f \quad (Ec. 16)$$

Siendo,

J_{AS} flux de permeado empleando fango en el ensayo ($\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)

3) Medida de la permeabilidad al agua destilada para determinar R_f :

- Se llena la jarra de alimentación con agua del grifo.
- Se conecta la bomba de alimentación y se establece un caudal de 50 L/h.
- Se abre totalmente la válvula de estrangulamiento situada en el tubo de rechazo.
- Se deja el sistema sin presión durante unos 15 minutos de forma que se va limpiando la superficie de la membrana.
- Transcurrido este tiempo, se vuelve a fijar una PTM de 300 mbar por medio de la válvula de estrangulamiento situada en el tubo de permeado.
- Se llena la jarra de alimentación con agua destilada.
- Transcurridos 10 minutos (tiempo en el que se considera que se ha alcanzado estado estacionario) se mide el caudal de permeado y se anota el valor obtenido.

R_f se obtiene mediante la ecuación 17:

$$R_f = \frac{PTM}{\mu \cdot J_w} - R_m \quad (Ec. 17)$$

Donde,

J_w flux de permeado después de la limpieza ($m^3/m^2 \cdot s$)

3.5.3 LA MEMBRANA

El material del cual se compone la membrana ensayada es polietersulfona hidrofílica (PES). Se trata de una membrana que por su tamaño de poro es clasificada como una membrana de UF. La UF engloba a todas aquellas membranas con un tamaño de poro entre 0,001 μm y 0,1 μm .

Concretamente, el tamaño de poro de esta membrana es de 0,04 μm . Las características suministradas por el fabricante se resumen en la tabla 3.9.

Tabla 3.9: Características de la membrana

Parámetro	Valor
Presión de operación	30 - 400 mbar
Presión de contralavado	Máx. 150 mbar
Rango de temperatura	5 - 55 °C
Rango de pH	2 - 11
Polímero de la membrana	PES
Tamaño de poro	0,04 μm
MWCO	150 kDa
Resistencia al cloro	100.000 ppm-h

Para caracterizar la membrana se llevó a cabo un estudio microscópico mediante microscopía de fuerza atómica (AFM en inglés) y microscopía electrónica de barrido (SEM en inglés).

El **microscopio electrónico de barrido** (Fig. 3.34) es un microscopio que proporciona imágenes de la superficie de la muestra mediante el escaneo superficial con un haz de electrones alta energía. Los electrones interactúan con los átomos que componen la superficie de la muestra produciendo señales que contienen información sobre la topografía de la superficie, su composición y otras propiedades como la conductividad eléctrica. En el interior de un SEM, un haz de electrones se emite térmicamente aplicando alto potencial sobre un filamento de tungsteno que conforma el cátodo.

Figura 3.34: Imagen de un microscopio SEM abierto



Procedimiento:

En primer lugar se procede a la preparación de muestras para la observación de las membranas mediante el microscopio electrónico de barrido.

Para la adecuación de las muestras a las características del dispositivo SEM, estas deben presentar un tamaño adecuado para caber en la cámara de muestras. Por ello se cortan pequeños trozos de membrana, de unos $0,25 \text{ cm}^2$ de superficie, y se pegan mediante cinta de carbono doble cara sobre el portamuestras utilizado en el laboratorio de microscopía.

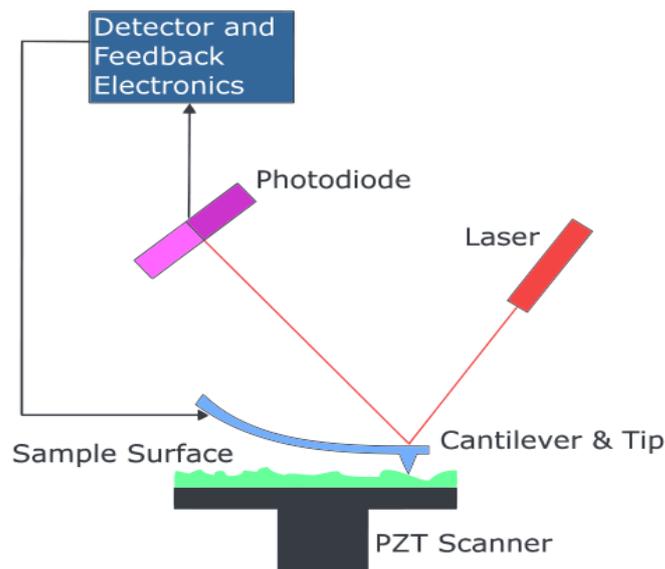
Para analizar la sección transversal de la membrana se cortan, previa fragilización por congelación mediante nitrógeno líquido para dañar lo menos posible la superficie cortada, otra muestras de membrana que se fija en el portamuestras especial para el análisis de secciones en el microscopio electrónico.

Para obtener las imágenes en el SEM, las muestras deben ser conductores de electricidad, al menos en la superficie, y deben estas conectadas a tierra para evitar la acumulación de cargas electrostáticas en la superficie. Por lo tanto, generalmente se cubre con una capa ultrafina de material eléctricamente conductor, generalmente oro, depositado sobre la muestra, ya sea por pulverización catódica o por evaporación de alto vacío. Además este recubrimiento permite amplificar la señal y la resolución de la superficie, especialmente con muestras de bajo número atómico. Una vez recubiertas las muestras se almacenan a la espera de su análisis en el microscopio.

La **microscopía de fuerza atómica** es un tipo de microscopía de barrido de alta resolución, de fracciones de un nanómetro, más de 1000 veces mejor que el límite de difracción óptica. Es una de las herramientas más importantes para obtener imagen, medir y manipular la materia a nanoescala. La información es recogida gracias al palpado de la superficie con una sonda mecánica. Un elemento piezoeléctrico facilita el desplazamiento de la sonda permitiendo un barrido superficial muy preciso.

En la figura 3.35 se muestra el esquema de funcionamiento de este microscopio.

Figura 3.35: Esquema de funcionamiento de un AFM



El voladizo es normalmente de silicio o nitruro de silicio con una punta de radio de curvatura del orden de nanómetros. Cuando la punta se pone en proximidad de una superficie de la muestra, las fuerzas que actúan entre la punta y la muestra provocan una desviación del voladizo de acuerdo a la ley de Hooke. La deformación se mide mediante un haz de láser que se refleja en la superficie superior del voladizo e incide sobre una matriz de fotodiodos.

Procedimiento:

La preparación de la muestra es muy sencilla y se puede realizar antes de la observación en el microscopio AFM, a diferencia de la observación en el SEM.

Se recorta un trozo de membrana y se coloca sobre el portaobjetos. A continuación se pone en el AFM y ya se puede comenzar la observación microscópica.

Por medio del AFM es posible obtener una imagen de la superficie de la membrana. La imagen obtenida puede ser analizada por medio de un programa de tratamiento de imagen como el NANOSCOPE y obtener la rugosidad superficial.

4. RESULTADOS

4.1 ENSAYOS PRELIMINARES

4.1.1 TOMA DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El primer análisis que se realizó fue el estudio de las condiciones óptimas de recepción de la muestra en el laboratorio. Para ello se tomaron tres muestras de un biorreactor de membranas y se transportaron en diferentes condiciones:

1. Muestra enfriada en una nevera portátil
2. Muestra aireada a temperatura ambiente
3. Muestra mantenida a temperatura ambiente

Para realizar la extracción se escogió el método Homogeneizador + CER y para el análisis químico el método BCA para analizar las proteínas y el método antrona para analizar los carbohidratos.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en las tablas 4.1 (proteínas) y 4.2 (carbohidratos).

Tabla 4.1: Concentración de proteína de una muestra de licor de mezcla recibida en diferentes condiciones

PROTEÍNAS: Método BCA			
Análisis	Conservación	Concentración (mgBSA/L)	mgBSA/gSSV
SMP	T Ambiente	4,885	1,00
	Enfriada	4,635	0,95
	Aireada	5,385	1,10
eEPS	T Ambiente	89,717	17,77
	Enfriada	87,019	18,32
	Aireada	65,586	13,39

En la tabla 4.1 se observa que los valores de proteínas obtenidos en la fracción soluble (SMP) son del mismo orden de magnitud.

Sin embargo, se aprecia que las eEPS de la muestra aireada poseen una concentración menor. Ello es debido a que el oxígeno activa a los microorganismos (aerobios facultativos), oxidando la materia orgánica de la que disponen en ausencia de sustrato externo.

Tabla 4.2: Concentración de carbohidratos de una muestra de licor de mezcla recibida en diferentes condiciones

CARBOHIDRATOS: Método Antrona			
Análisis	Conservación	Concentración (mgGlucosa/L)	mgGlucosa/gSSV
SMP	T Ambiente	4,512	0,92
	Enfriada	9,950	2,03
	Aireada	4,960	1,98
eEPS	T Ambiente	12,794	4,04
	Enfriada	15,213	3,11
	Aireada	11,152	2,28

En la tabla 4.2 se observa que la fracción soluble que mayor concentración de carbohidratos tiene es la de la muestra enfriada, mientras que la de menor concentración es la de la muestra transportada a temperatura ambiente. Este fenómeno puede ser debido a que los carbohidratos presentes en la fracción soluble se consumen rápidamente por parte de los microorganismos durante el periodo de transporte y la refrigeración favorece la conservación.

En cuanto a los eEPS la muestra que mayor cantidad de carbohidratos extrae (en mgGlucosa/gSSV) es la transportada enfriada, seguida de la de temperatura ambiente y por último la aireada, indicando que el licor de mezcla es bastante estable con respecto a la temperatura. Sin embargo, la aireación sí que le afecta al igual que sucedía con las proteínas.

Tras analizar los datos se puede confirmar que el licor de mezcla es bastante estable con respecto a la temperatura, ya que tanto en el caso de las proteínas como en el caso de los carbohidratos los valores son bastante parecidos entre sí, si bien los casos más favorables son los de las muestras enfriadas. Sin embargo, la aireación sí que le afecta.

Por ello, se decidió que las muestras fueran transportadas refrigeradas para minimizar la influencia de la temperatura estacional en el licor de mezcla y así todas las muestras tuvieran las mismas condiciones de conservación. Además, de esta forma, se reduce el factor temporal sobre la distancia a la que esté ubicada la depuradora del laboratorio.

4.1.2 SELECCIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Se han analizado las proteínas y los carbohidratos tanto de productos solubles microbianos (SMP) como de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS).

Los métodos de **análisis de proteínas** propuestos en primer lugar fueron:

- Método BCA

- Método de Lowry
- Método de Bradford

Se han seleccionado los dos primeros métodos analíticos porque el método de Bradford es un método no lineal a elevadas concentraciones de proteína y presenta interferencias con detergentes. El método BCA es el método más sensible de los tres y el que menos interferencias muestra. El método de Lowry tiene bastante sensibilidad pero se ha observado que los detergentes le originan interferencias, por lo que no se puede utilizar en el caso de que el proceso de extracción se haya realizado con el detergente Triton X-100.

Además, en la búsqueda en artículos científicos se encontró que BCA y Lowry eran los más adecuados y usados para medir las concentraciones de proteínas del licor de mezcla.

En cuanto a los métodos de **análisis de carbohidratos** planteados en primer lugar fueron:

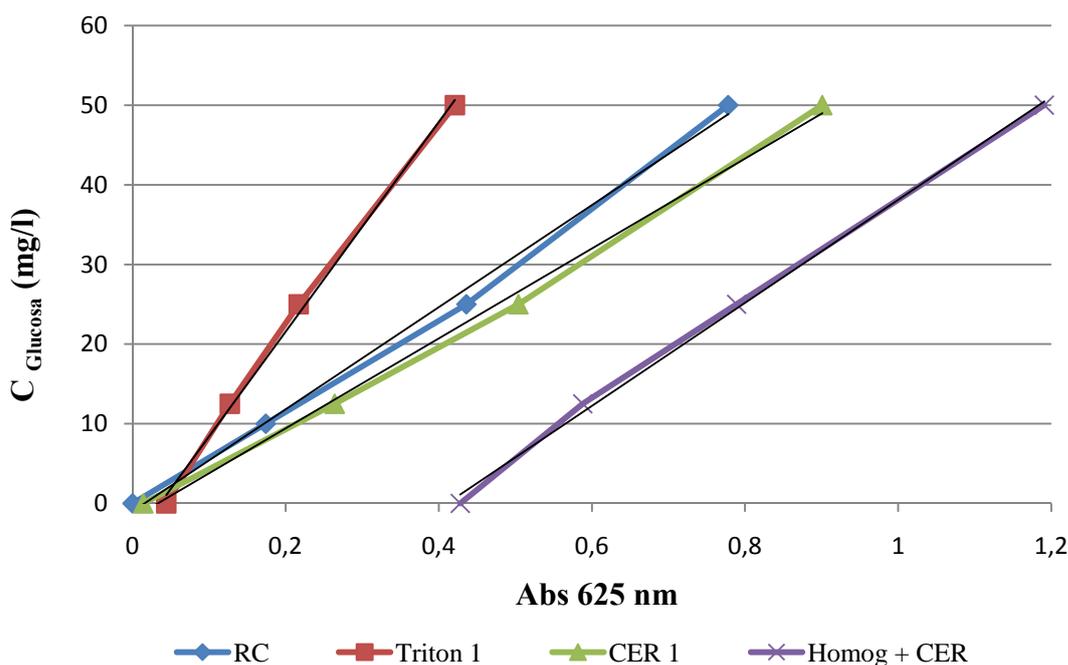
- Método de la antrona
- Método de Dubois
- Método de la hexoquinasa

El método seleccionado fue el de la antrona, ya que se comprobó que la hexoquinasa exclusivamente se puede utilizar para determinar glucosa y el método de Dubois resulta muy tóxico ya que implica el uso de fenol además de ácido sulfúrico en mayor cantidad que en el método de la antrona. El problema que se ha presentado con este método es que presenta interferencias con detergentes por lo que las muestras extraídas con Triton X-100 no pueden ser analizadas con antrona, tal y como se muestra en el gráfico 4.1 de adición estándar. Por ello, para las muestras extraídas con el método Triton X-100 los carbohidratos se han analizado con Dubois, que se ha demostrado que no interfiere con el Triton.

En el gráfico 4.1 se observa cómo las rectas de adición estándar de las dos extracciones con resina de intercambio iónico son paralelas a la recta de calibrado y en cambio la recta de la extracción con Triton X-100 tiene una pendiente mucho más acusada, indicando que hay una clara interferencia entre el método de extracción y el método de análisis.

Visualmente también se observaba que el tono de las muestras del análisis realizado con Triton X-100 era más marrón que el resto de muestras.

Gráfico 4.1: Comparación de adición estándar de diferentes muestras con antrona



Tal y como se comentó en el apartado 3.4.1, se realiza un triple análisis de cada muestra: adición estándar, muestra pura y muestra diluida a la mitad para obtener unos datos más fiables. Por ello cada dato que se muestre ha sido seleccionado de entre los tres mencionados. En el Anexo I se muestra un análisis completo de una muestra, en el que se presentan todos los datos recogidos en tablas y la comparación de los tres análisis.

4.1.3 SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

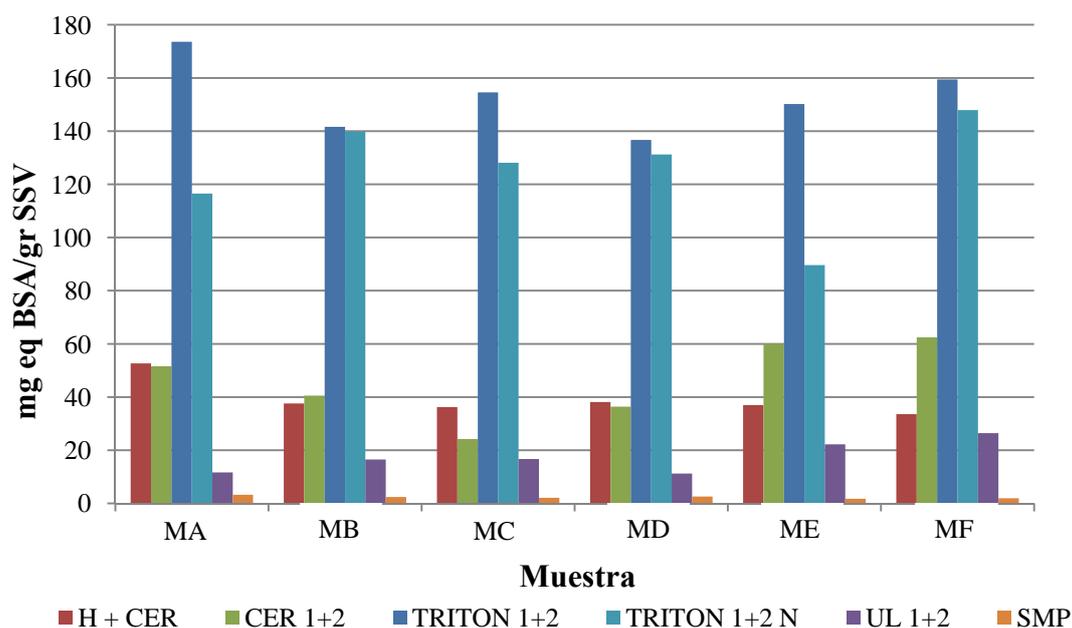
En un primer estudio se aplicaron diferentes métodos de extracción al licor de mezcla para comprobar cuales eran las que más concentración de proteínas/carbohidratos extraían sin llegar a romper la membrana celular, es decir, con la mínima concentración de ADN.

Los **métodos de extracción** ensayados fueron los siguientes:

- Homogeneizador + CER (H + CER)
- CER en dos etapas (CER 1+2)
- Triton X-100 0,5% en dos etapas (TRITON 1+2)
- Triton X-100 0,25% en dos etapas (TRION 1+2 N)
- Homogeneizador Ultra-Turrax en dos etapas (ULT)

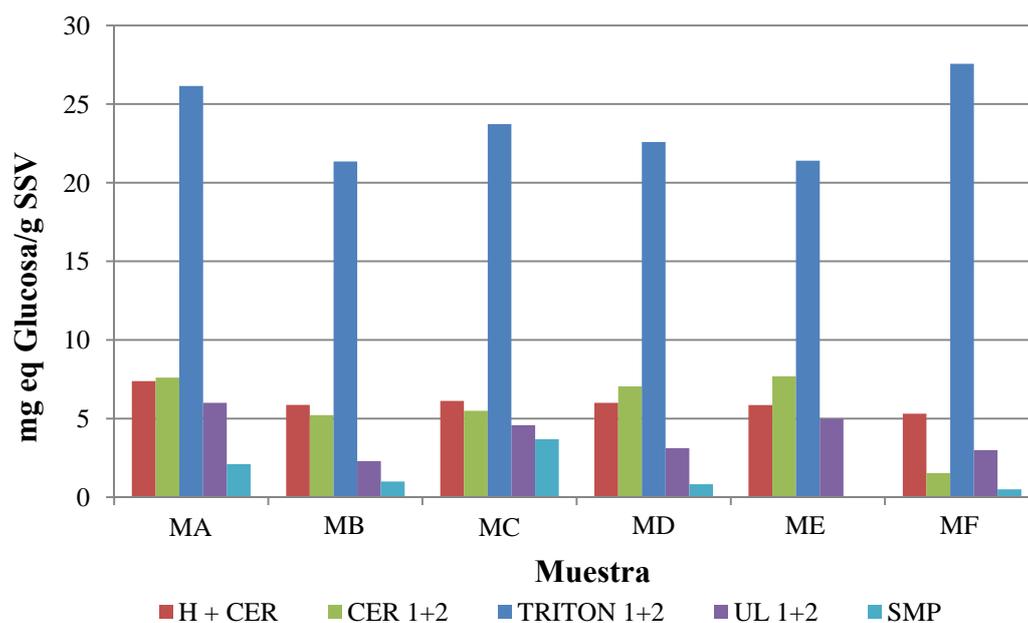
En el gráfico 4.2 se pueden ver los resultados del análisis de proteínas en seis muestras de licor de mezcla tras ser sometidas a los métodos de extracción previamente mencionados.

Figura 4.2: Concentración de proteínas en las eEPS y SMP obtenidos con los distintos métodos de extracción



En la figura 4.3 se muestran los resultados del análisis de carbohidratos de las muestras anteriores. Los ensayos se han realizado con el método de la antrona a excepción del caso del Triton que, como se ha comentado anteriormente, interfiere con el detergente por lo que se ha utilizado el método de Dubois. Sólo se han analizado los carbohidratos de los ensayos realizados a una concentración de Triton X-100 0,5% debido a su toxicidad.

Figura 4.3: Concentración de carbohidratos en las eEPS y SMP obtenidos con los distintos métodos de extracción

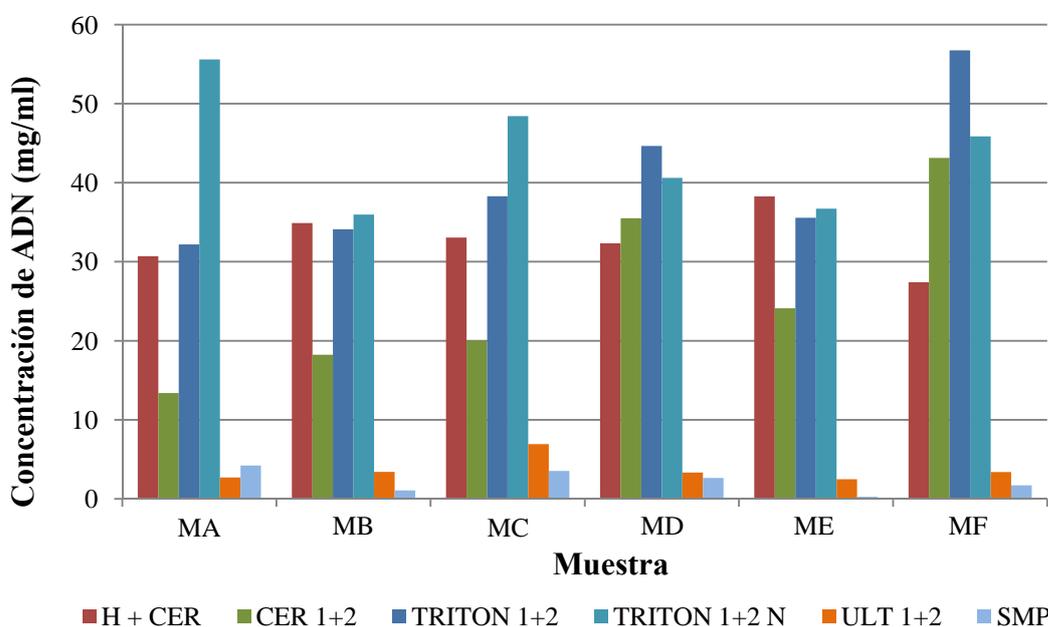


De las figuras 4.2 y 4.3 se deduce que el método que mayor concentración de proteínas y carbohidratos extrae es el Triton X-100 (140 mgBSA/gSSV y 22 mgGlucosa/gSSV), seguido de los dos métodos que utilizan CER (40 mgBSA/gSSV y 7 mgGlucosa/gSSV).

Tal y como se observa en las figuras anteriores, los productos solubles microbianos tienen una cantidad muy pequeña de proteínas y carbohidratos, 3 mgBSA/gSSV y 1,8mgGlucosa/gSSV respectivamente. Ello puede ser debido a que los SMP se consumen rápidamente durante el proceso de transporte.

En el gráfico 4.4 se muestran los resultados del análisis de ADN a las muestras extraídas, el cual sirve para ver qué métodos son más agresivos para las células y por lo tanto liberan más cantidad de ADN.

Gráfico 4.4: Análisis de ADN tras las extracciones



A la vista de los resultados se puede concluir que los métodos que mayores concentraciones de ADN extraen son los que utilizan Triton X-100 en su extracción. Como las dos concentraciones de detergente empleadas (0,5% y 0,25%) extraen similares cantidades de ADN, así como de proteínas, se decide continuar con los ensayos sólo con la concentración de 0,5%, que es la más utilizada en bibliografía.

A continuación, está el método H + CER, seguido del método que utiliza CER exclusivamente. La razón de ello puede ser que el primer método mantiene durante 4 h la resina de intercambio iónico en contacto con el licor de mezcla y en cambio el segundo un total de 2 h en dos etapas. Además, estos resultados junto con los realizados en la figura 4.2 prueban que es más eficaz el método CER que el H + CER puesto que la concentración de proteínas obtenidas en CER es igual o superior a H + CER.

El método que realiza la extracción con el homogeneizador Ultra-Turrax es el que menos proteínas y carbohidratos extrae, así como ADN, ya que es un método físico muy poco efectivo por lo que se decide no continuar con él en ensayos posteriores.

También se observa cómo la concentración de ADN presente en los SMP es aproximadamente 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Así, los análisis de ADN en los SMP nos permiten afirmar que la presencia de ADN en el licor de mezcla antes de las extracciones es despreciable.

4.1.4 COMPARACIÓN ENTRE CONVENCIONAL Y BRM

La depuradora de la que se han tomado las muestras de fango contaba con dos líneas en paralelo, un proceso convencional y un biorreactor de membranas por lo que la idea original era poder comparar químicamente ambos procesos de depuración. Sin embargo, debido a problemas de disminución del caudal de agua residual recibida, el proceso convencional se vio alterado y se decidió centrarse en el proceso BRM de una EDAR más cercana.

Aún así se han realizado algunos análisis al proceso convencional, los cuales se muestran en los gráficos 4.5 y 4.6, en los que se observa la concentración de proteínas y carbohidratos de tres muestras analizadas.

Gráfico 4.5: Concentración de proteínas en las eEPS y SMP del proceso convencional

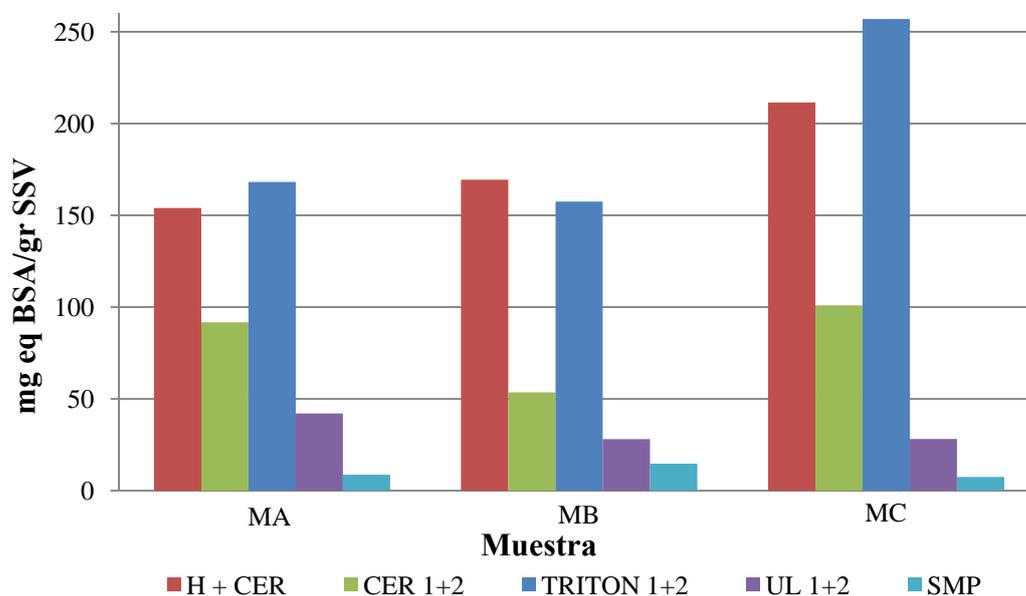
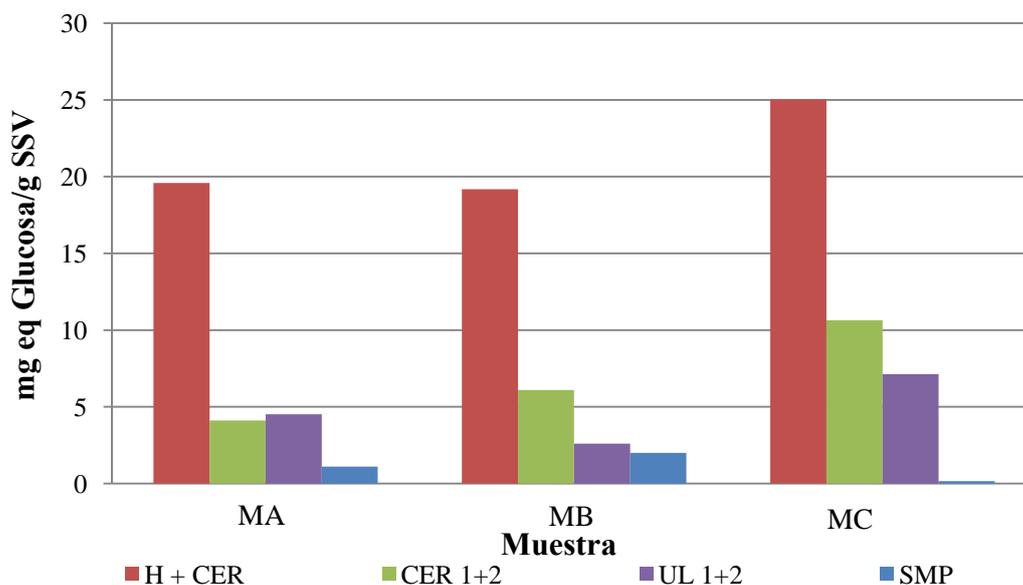


Gráfico 4.6: Concentración de carbohidratos en las eEPS y SMP del proceso convencional



El análisis de carbohidratos del fango extraído con Tritón X-100 se realizó con el método de Dubois, y el de las extracciones con resina y ultraturrax con antrona.

Con estas tres muestras analizadas se puede decir que la concentración de proteínas de las eEPS en el proceso convencional es alrededor de 75-150 mgBSA/gSSV y la de carbohidratos es de 10-20 mgGlucosa/gSSV. En cuanto a los SMP las concentraciones son 8 mgBSA/gSSV y 1,3 mgGlucosa/gSSV, aunque se deberían realizar más análisis para confirmarlo. Comparando estos valores con los obtenidos en el BRM se obtiene que el fango del proceso convencional tiene más concentración de EPS que el BRM, el cual según se observa en las gráficas 4.2 y 4.3 variaba entre 50-100 mgBSA/gSSV y 7-20mgGlucosa/gSSV.

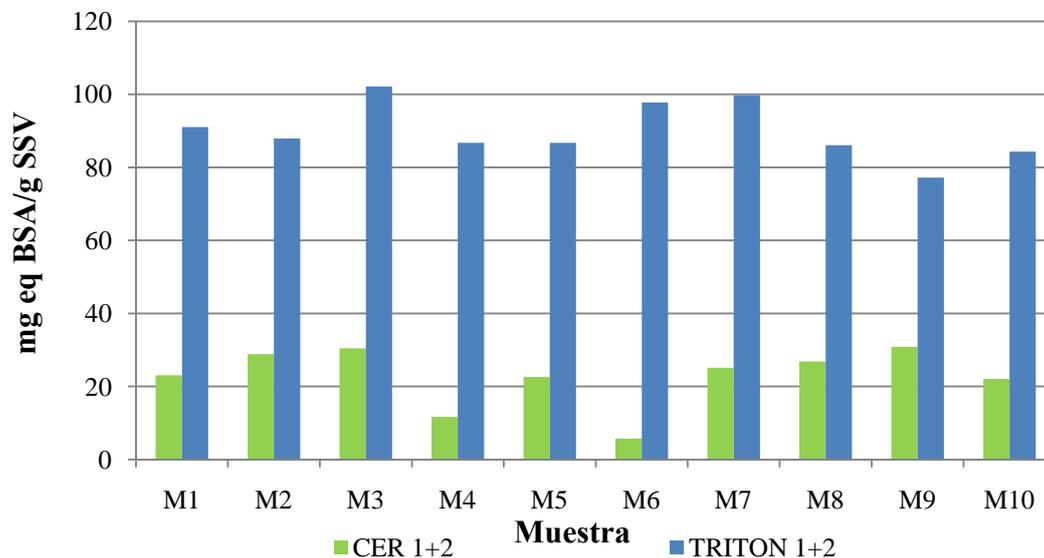
Al igual que sucedía con las extracciones del licor de mezcla del BRM, los métodos que mayor cantidad de proteínas y carbohidratos extraen son el Triton X-100 y el H + CER. Tanto en proteínas como en carbohidratos el método ultraturrax es el que menos cantidad de proteínas/carbohidratos extrae, lo que confirma la decisión de descartarlo para extracciones posteriores, seguido del método CER en dos etapas.

4.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Una vez seleccionados los métodos de extracción y análisis se procede al análisis adicional de diez muestras de licor de mezcla espaciadas en el tiempo, de las que se realizará una caracterización química y se realizará un estudio de las resistencias a la filtración y tiempo de succión capilar.

En el gráfico 4.7 se muestran las concentraciones de proteínas extraídas con los procesos de extracción CER en dos etapas y Triton X-100 0,5% en dos etapas también. Las proteínas se han analizado con el método BCA.

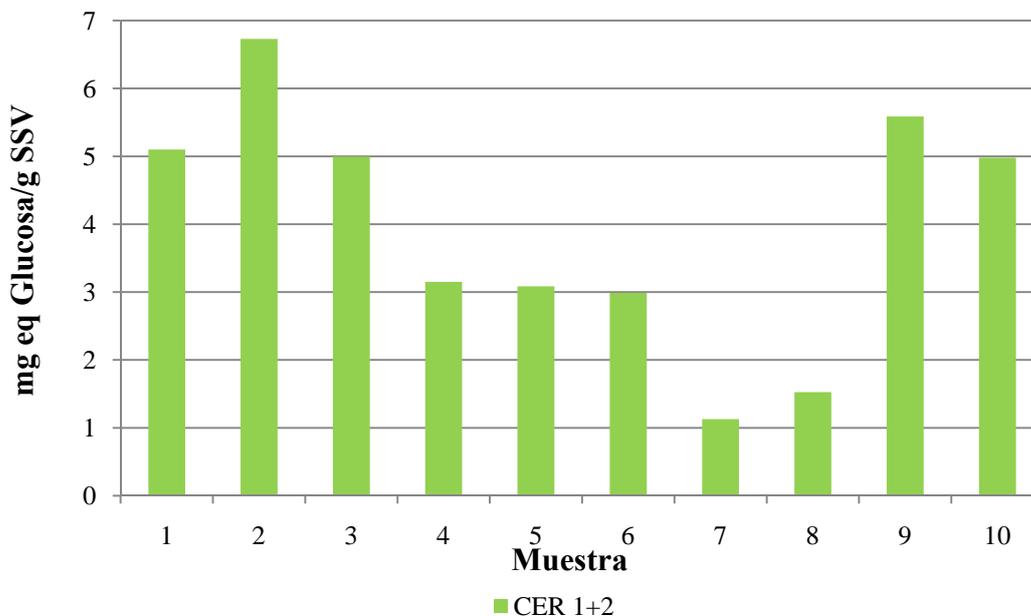
Gráfico 4.7: Concentración de proteínas contenidos en las eEPS



Como se puede observar, el método de extracción con Triton X-100 extrae muchas más proteínas (90 mgBSA/gSSV) que el método CER (23 mgBSA/gSSV).

El análisis de carbohidratos de las mismas muestras se muestra en la figura 4.8.

Gráfico 4.8: Concentración de carbohidratos en las eEPS extraídos con CER



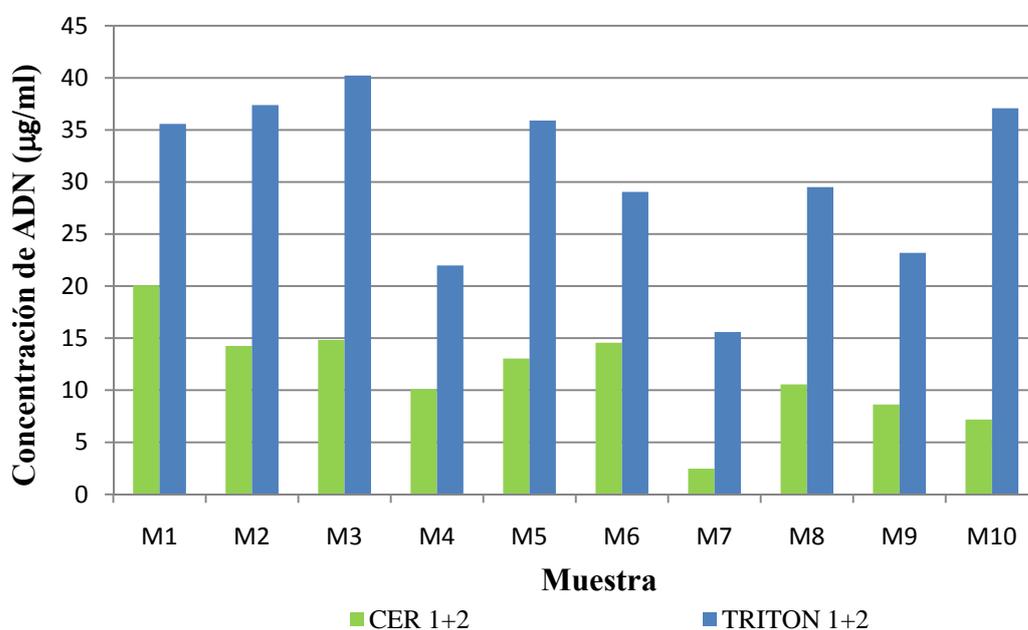
Las concentraciones mostradas en el gráfico anterior se han obtenido con el método de la antrona, e indican que la concentración media de carbohidratos presentes en el fango del BRM es de 4 mgGlucosa/gSSV aproximadamente.

El método de Dubois sólo se aplicó a cuatro muestras de extracto de Triton X-100 por ser un método muy tóxico. Los resultados muestran que la concentración media de carbohidratos es de 20 mg Glucosa/gSSV, valor superior al obtenido mediante el método CER.

En el gráfico 4.9 se muestra la concentración de ADN extraída en cada una de las muestras. Estos análisis se han realizado con el kit de mayor rango, es decir de 2 a 1000ng.

La finalidad de este análisis es ver si se cumple que el análisis que más proteínas y carbohidratos extrae también es el que mayor cantidad de ADN libera. El ADN liberado interferirá en la medida de proteínas y carbohidratos ya que dará un valor más elevado de los mismos.

Gráfico 4.9: Concentración de ADN en las eEPS



Estos resultados confirman que la extracción con Triton X-100 extrae mayor cantidad de ADN que la extracción llevada a cabo con la resina CER, siendo de 30,5 µg/mL el promedio de ADN liberado con el Triton X-100 y de 11,5 µg/mL el liberado con la resina.

En cuanto a los productos solubles microbianos, en las gráficas 4.10 y 4.11 se muestran las concentraciones de proteínas y carbohidratos presentes en los mismos. Al ser los valores esperados de proteínas muy pequeños se ha utilizado el método de análisis Micro BCA.

Gráfico 4.10: Concentración de proteínas en los SMP

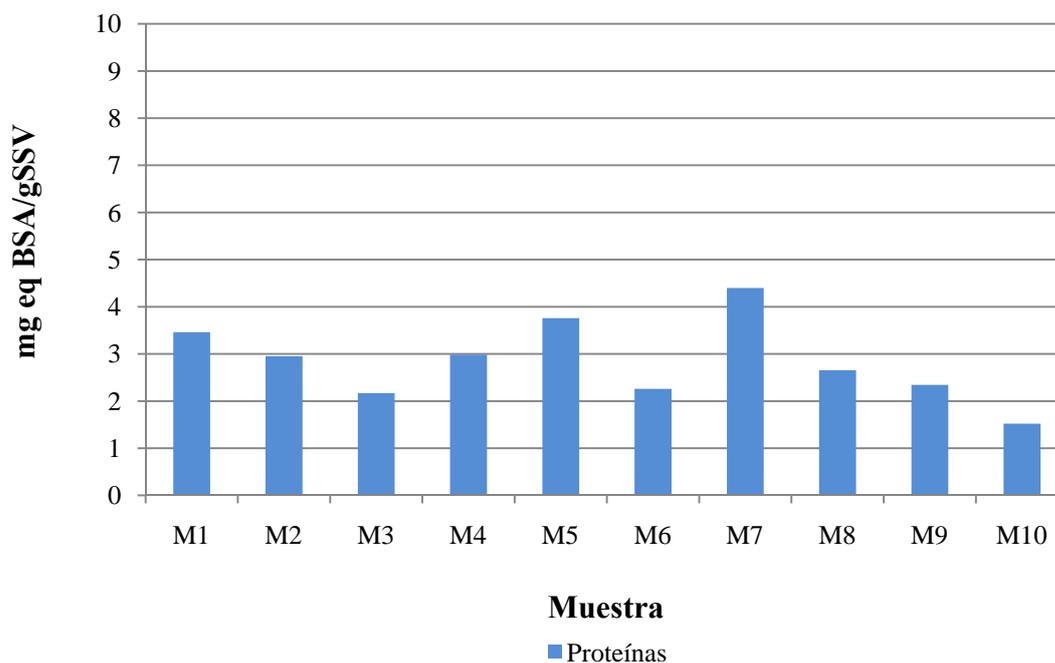
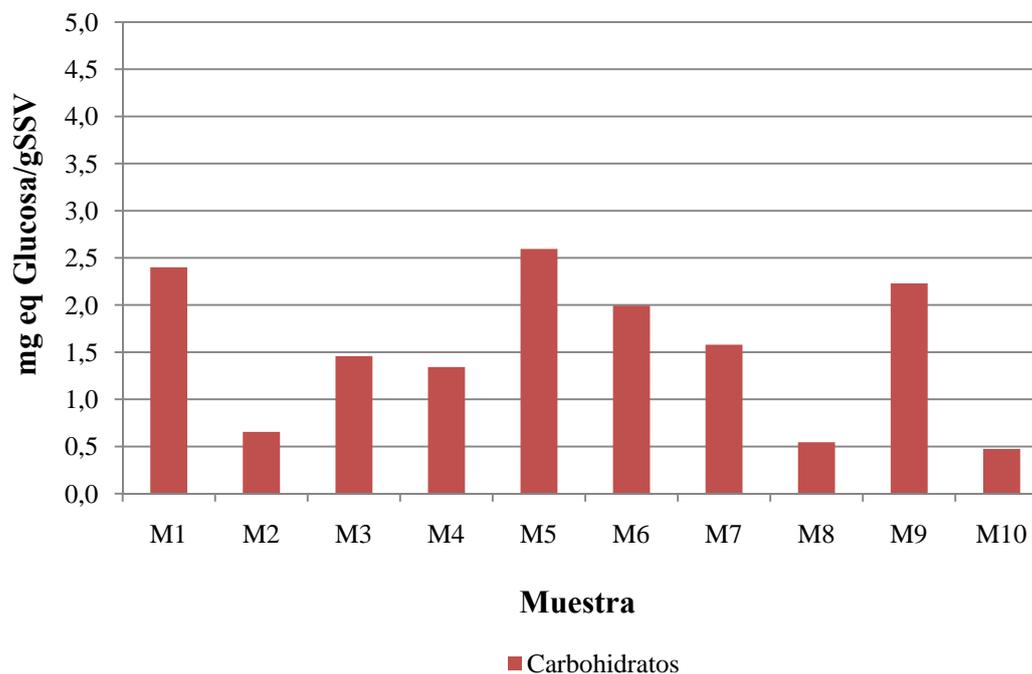
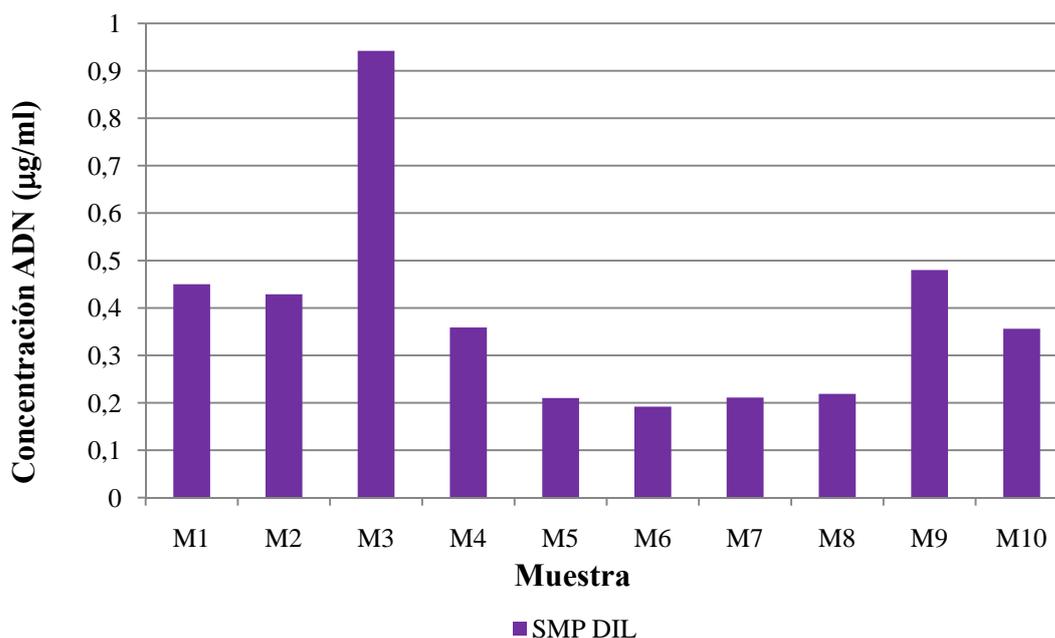


Gráfico 4.11: Concentración de carbohidratos en los SMP



En el gráfico 4.12 se muestra la concentración de ADN encontrada en los SMP, como se observa es una concentración muy baja, del orden de $0,3 \mu\text{g/mL}$ sin contar la muestra tres que es más elevada, posiblemente debido a algún error experimental.

Gráfico 4.12: Concentración de ADN en los SMP



A modo de resumen, en la tabla 4.3 se recogen los valores medios con sus correspondientes desviaciones estándares de proteínas y carbohidratos de las eEPS y los SMP.

Tabla 4.3: Concentraciones medias de proteínas y carbohidratos en eEPS y SMP

	SMP		eEPS Método CER 1+2		eEPS Método 0,5% Triton X-100	
	Media	σ	Media	σ	Media	σ
Proteínas (mgBSA/gSSV)	2,850	0,850	22,717	8,159	89,959	7,764
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	1,319	0,844	3,797	1,887	22,475	1,877
ADN (µg/mL)	0,385	0,224	11,571	4,890	30,549	8,108

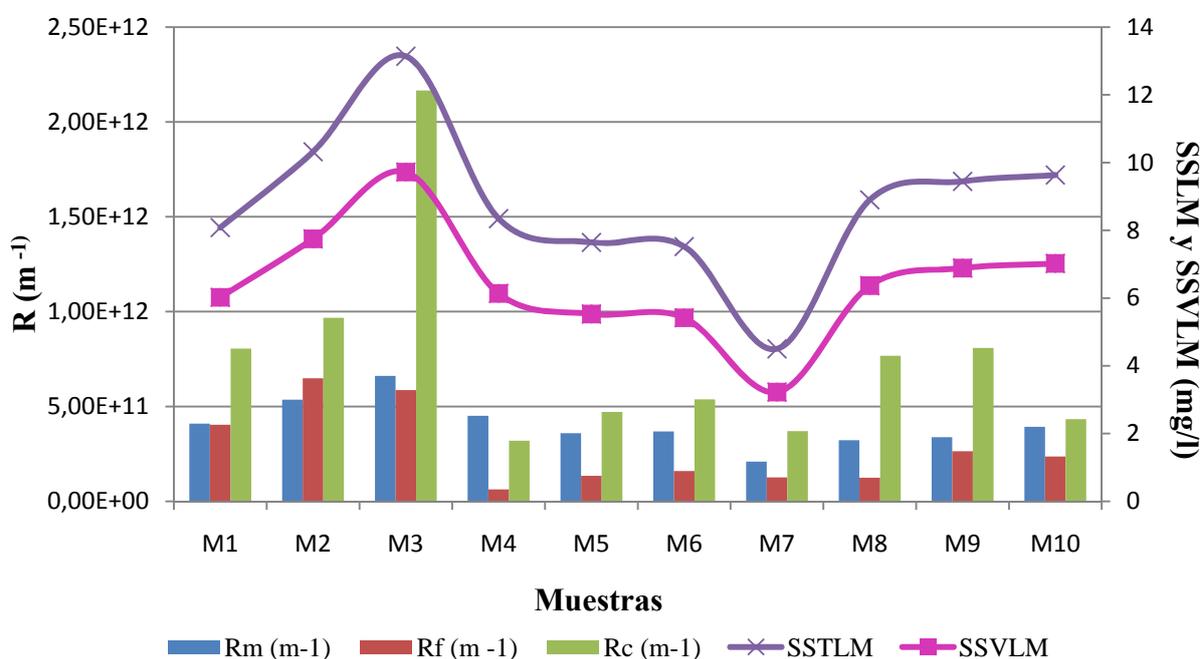
Con los resultados reflejados en esta tabla y en las gráficas anteriores (4.7 - 4.11) se confirma que las concentraciones de proteínas, carbohidratos y ADN en los SMP son inferiores a las obtenidas en las eEPS, si bien, el método Triton extrae más cantidad que el método CER.

La desviación estándar indica la desviación de los datos respecto al valor medio. Se observa que existe variabilidad entre las muestras, ya que se trata de diez muestras distintas, tomadas en diferentes semanas por lo que las características de la alimentación pueden variar entre ellas.

4.3 RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN Y TSC

Los resultados de resistencias a la filtración se refieren a ensayos realizados en una planta piloto con una membrana de ultrafiltración. En el gráfico 4.13 se observa la relación que existe entre SSLM y SSVLM de las muestras de licor de mezcla con las resistencias obtenidas. Cabe comentar que para cada ensayo de filtración se realizó un recorte nuevo de la misma membrana. R_m hace referencia a la resistencia intrínseca de la membrana (membrana limpia), R_f es la resistencia que causan las sustancias adsorbidas y que quedan retenidas en los poros de la membrana, es decir, sólidos disueltos y coloidales y R_c debida a los sólidos que forman la torta.

Gráfico 4.13: Resistencias a la filtración representadas frente a las muestras



Tal y como se puede observar en la gráfica anterior, a lo largo de todas las experiencias los sólidos no se mantuvieron constantes en el biorreactor de membranas, produciéndose el pico de SSLM más alto en la muestra tres de 13.138 mg/L (74% SSVLM) y el más bajo en la muestra siete de 4.502 mg/L (71,6% SSVLM). Sin embargo, la relación entre SSLM y SSVLM se ha mantenido prácticamente constante en todas las muestras, siendo los SSVLM un promedio del 73% de los SSLM.

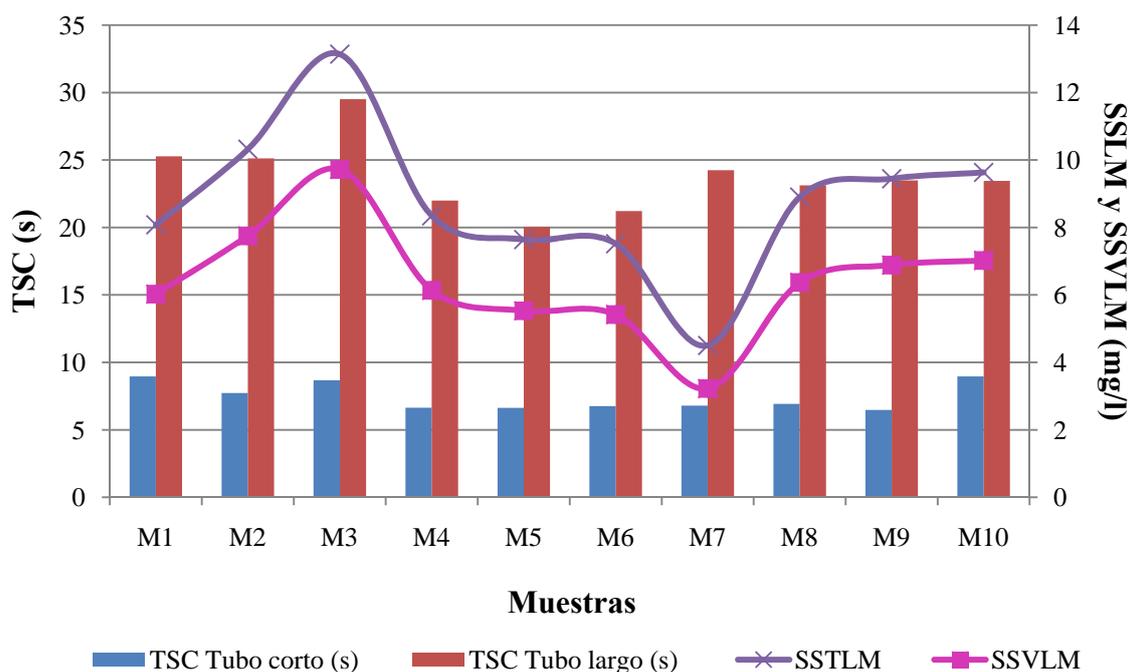
Comparando estos valores de sólidos con las resistencias a la filtración se comprueba que la concentración de sólidos más elevada corresponde a resistencias elevadas y la concentración de sólidos baja corresponde a resistencias bajas y por tanto se puede afirmar que existe relación entre estos parámetros.

Cabe comentar que la resistencia de la membrana (R_m) es muy similar en todos los ensayos. Las variaciones encontradas entre estos valores se deben al diferente recorte de la misma membrana utilizado en cada ensayo.

La resistencia provocada por las partículas sólidas es, de forma general, superior a la generada por las partículas disueltas. Y, por lo tanto, $R_c > R_f$. Como consecuencia, el ensuciamiento que prevalece es reversible dado que la torta retenida sobre la superficie de la membrana se puede eliminar con relativa facilidad.

En el gráfico 4.14 se muestra la medida del tiempo de succión capilar, realizado con tubo largo para un filtrado lento (diámetro de apertura de 1 cm) y tubo corto para un filtrado rápido (diámetro de apertura de 1,8 cm).

Gráfico 4.14: Tiempo de succión capilar



Los resultados del TSC muestran que cuanto menor es la mineralización del fango (mayor concentración de SSVLM) menos deshidratable es y los valores de TSC aumentan.

Se observa que los resultados que se obtienen con el filtrado lento (tubo largo) son mejores que los del filtrado rápido, ya que siguen la tendencia esperada, a mayor cantidad de SSTM y SSVLM mayor es el TSC, en cambio en tubo corto los valores del TSC son muy parecidos en todos los casos. Siguiendo estos razonamientos, los valores de TSC esperados para la M7 deberían ser menores. Sin embargo, el valor del TSC obtenido puede justificarse como un error experimental o es posible que llegue un punto en que las concentraciones pequeñas de SSTM no afecten al TSC.

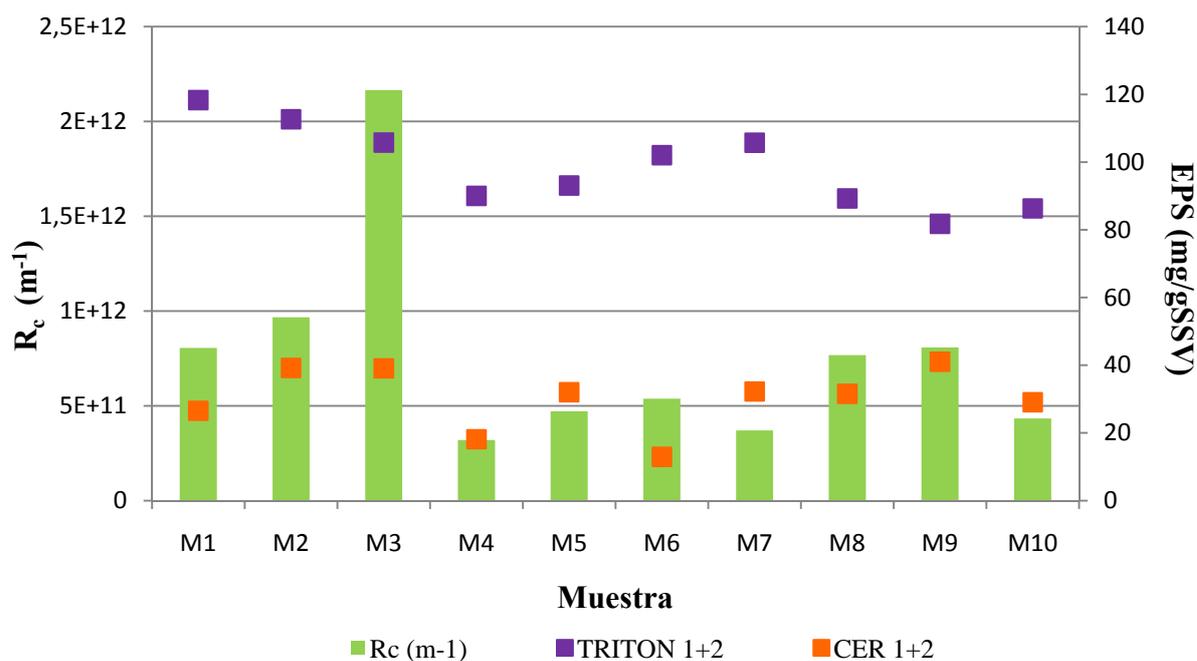
4.4 CORRELACIÓN ENTRE LAS EPS, SMP, RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN Y TSC

A continuación, se van a mostrar las gráficas que relacionan la resistencia a la torta (R_c), a las partículas disueltas y coloidales (R_f), la suma de ambas y la resistencia total (R_t) con el TSC, la concentración de EPS (suma de eEPS y SMP), los SMP y, en el caso de la resistencia a la torta, también con la concentración de sólidos totales y volátiles en el licor de mezcla.

4.4.1 INFLUENCIA DE LAS EPS EN LAS RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN

En el gráfico 4.15 se observa el efecto de la concentración de las EPS, tanto las extraídas con el método CER como las extraídas con el Triton en dos etapas, en la resistencia debida a la capa de torta formada sobre la superficie de la membrana.

Gráfico 4.15: Relación entre R_c y EPS extraídas con Triton X-100 y CER en dos etapas



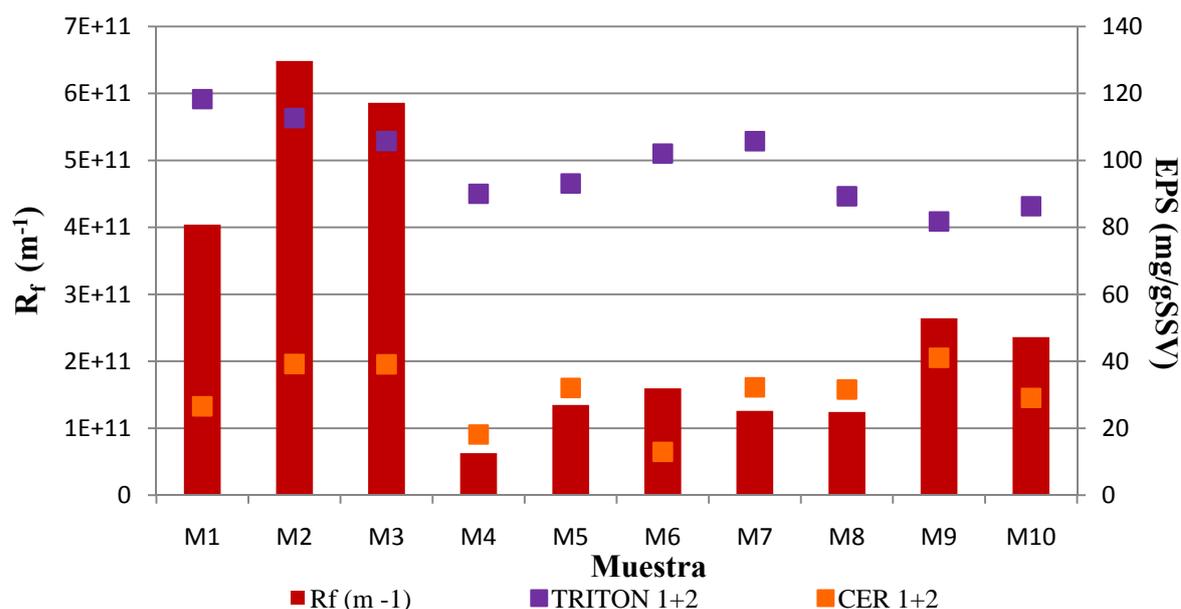
Observando la figura anterior se puede decir que la concentración de EPS obtenidas con el método Triton no presenta ninguna relación con la resistencia a la formación de la torta, en cambio la concentración de EPS obtenidas con el método CER sí presenta una relación ya que, al aumentar la concentración de EPS aumenta la resistencia y al disminuir las EPS también disminuye la R_c . Sólo en las muestras 3 y 6 los valores de las EPS deberían ser mayores.

Como se ha comentado anteriormente, la concentración de eEPS obtenida con el proceso de extracción con el detergente es mucho mayor que la obtenida con el método

de la resina de intercambio iónico ya que, el método Triton X-100 es un método más agresivo y extrae más cantidad de proteínas, carbohidratos y ADN de la célula. Sin embargo, a pesar de que las concentraciones son mayores, estas no afectarían a la R_c . Este comportamiento se podría justificar considerando que sólo las EPS que están en la superficie de la célula son las responsables de formar agregados celulares.

En el gráfico 4.16 se muestra la resistencia R_f , es decir, la causada por la adsorción de partículas disueltas y coloidales en los poros y paredes de la membrana, con las concentraciones de EPS obtenidas de los dos métodos de extracción.

Gráfico 4.16: Relación entre R_f y EPS extraídas con Triton X-100 y CER en dos etapas



Al igual que sucedía con la R_c , la resistencia generada por las partículas disueltas y coloidales y la extracción con Triton X-100, en general, la influencia que ejercen las EPS obtenidas con el método Triton X-100 sobre R_c no presentan una relación muy significativa.

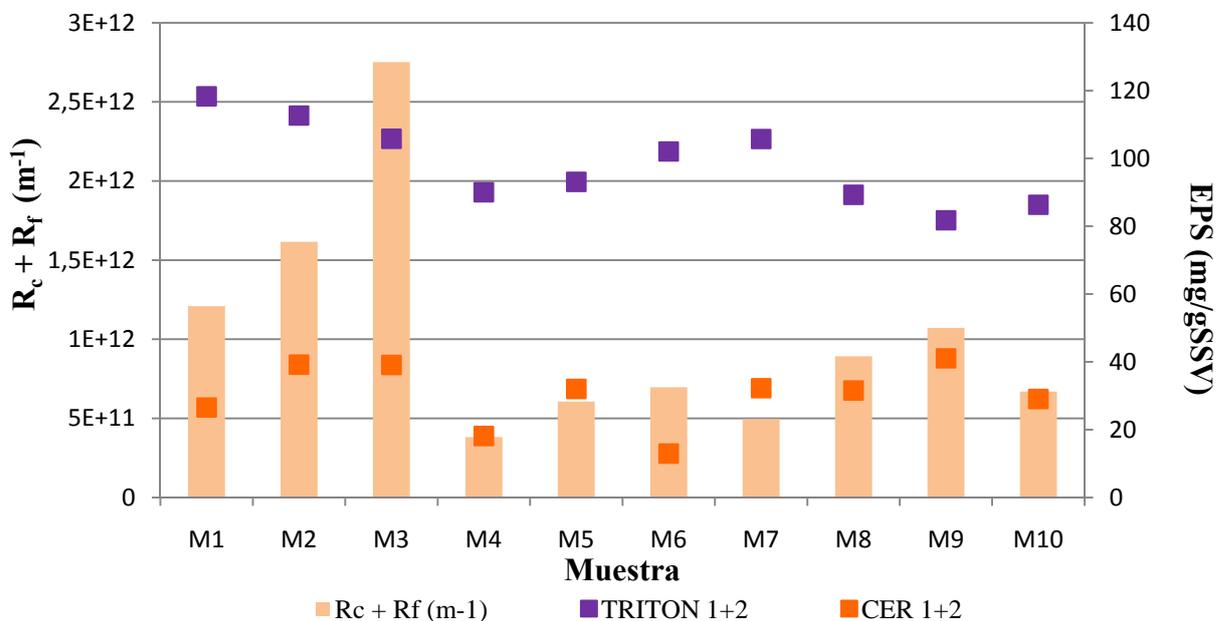
En el caso de las EPS obtenidas con el método CER, al tener una concentración de EPS menor es más fácil observar la correlación existente.

En este caso y para las muestras 2, 3 y 6 era de esperar que tuvieran una resistencia menor. Estos resultados pueden justificarse al haber cometido algún error experimental o bien puede ser que el ensuciamiento haya sido causado por otro factor, como puede ser la elevada concentración de SSLM, ya que las muestras 2 y 3 coinciden con valores elevados de sólidos en el licor de mezcla.

En la gráfico 4.17, se encuentra representada la suma de las resistencias debidas a la torta y a las partículas coloidales. En este caso no se incluye R_m ya que, como se ha comentado para el gráfico 4.13, es prácticamente constante en todas los ensayos, por tratarse de diferentes recortes de la misma membrana. Las conclusiones que se obtienen son las mismas que en los gráficos anteriores, es decir, que la concentración de EPS

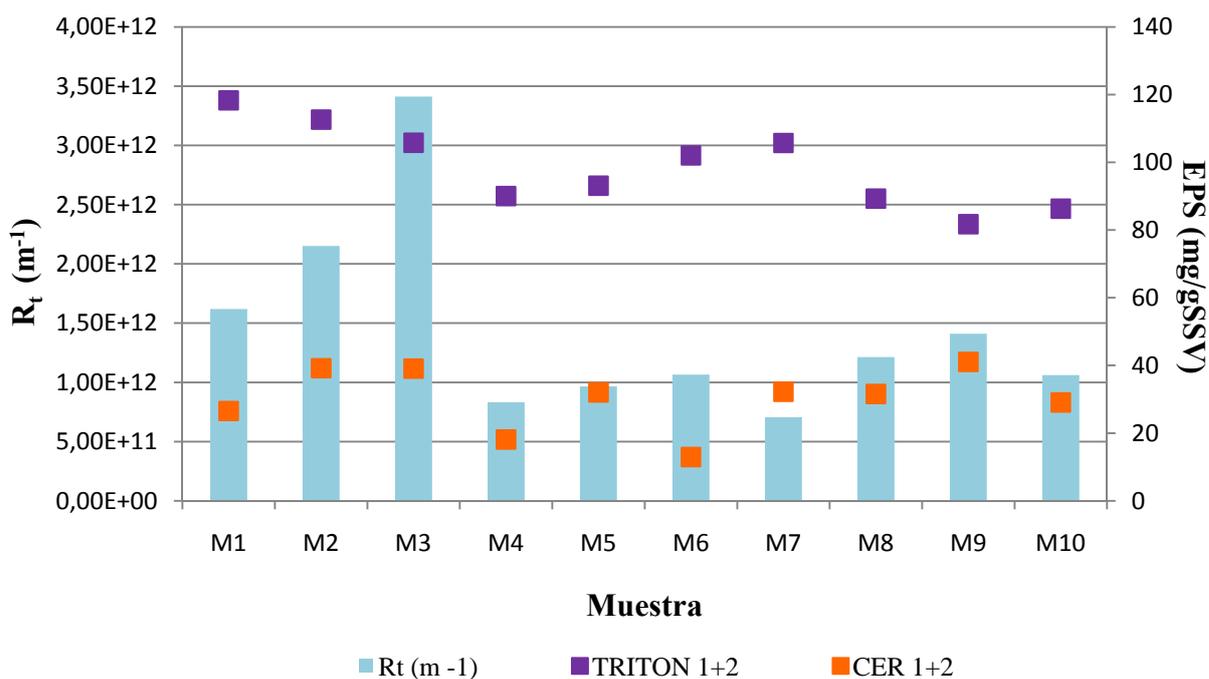
calculada con la extracción CER está más relacionada con $R_c + R_f$ que la de la extracción con Triton.

Gráfico 4.17: Relación entre $R_c + R_f$ y EPS extraídas con Triton X-100 y CER en dos etapas



Por último, queda comparar la concentración de EPS con la resistencia total del fango a ser filtrado por la membrana, la cual se puede ver en el gráfico 4.18.

Gráfico 4.18: Relación entre R_t y la concentración de EPS extraídas con Triton X-100 y CER en dos etapas



El valor de la R_t mayor corresponde al de la muestra tres. Tal y como se ha comentado anteriormente esta muestra corresponde con la concentración mayor de sólidos en el licor de mezcla por lo que se considera que llegado un valor muy elevado de los mismos (13.000 mg/L) afectan más al ensuciamiento que la concentración de EPS.

El resto de muestras correspondientes a la extracción CER (a excepción de la M6), cumplen que a mayor concentración de EPS la resistencia ofrecida al paso por la membrana es mayor.

4.4.2 INFLUENCIA DE LOS SMP EN LAS RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN

A continuación, se representa en los gráficos 4.19 y 4.20 la influencia de la concentración SMP sobre R_c y R_f .

Gráfico 4.19: Relación entre R_c y concentración de SMP

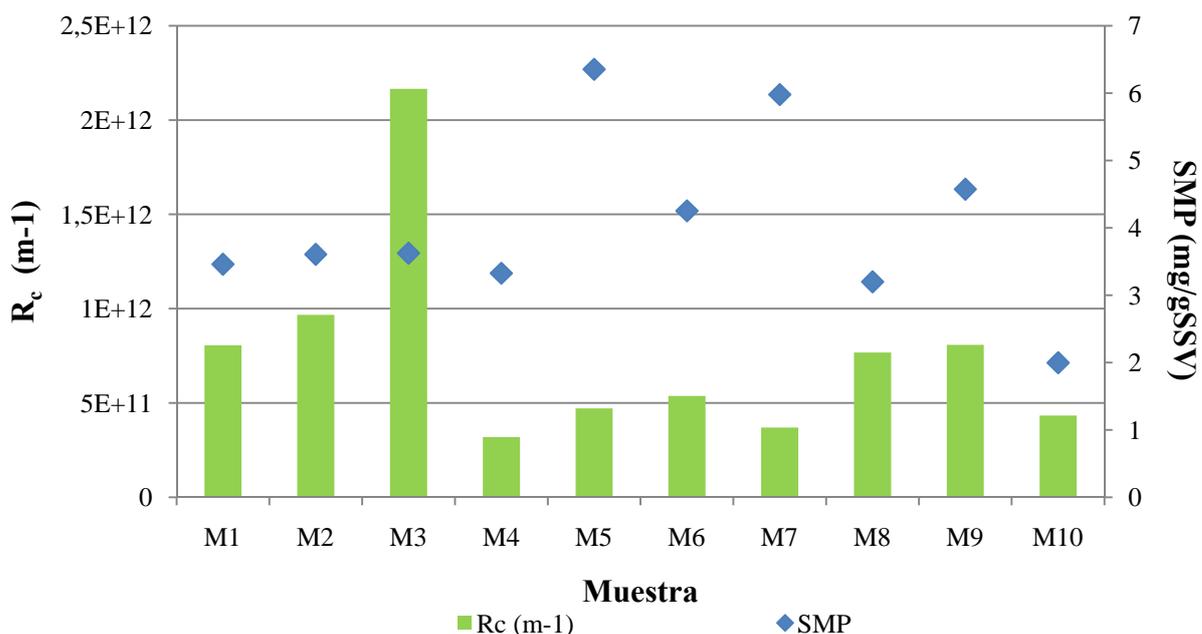
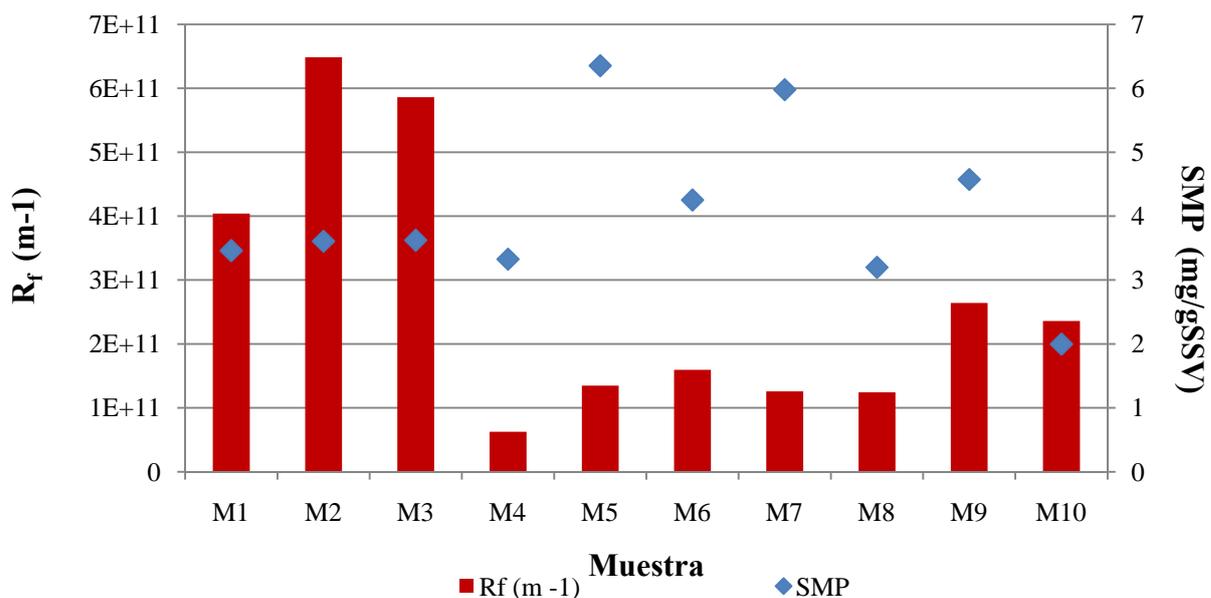
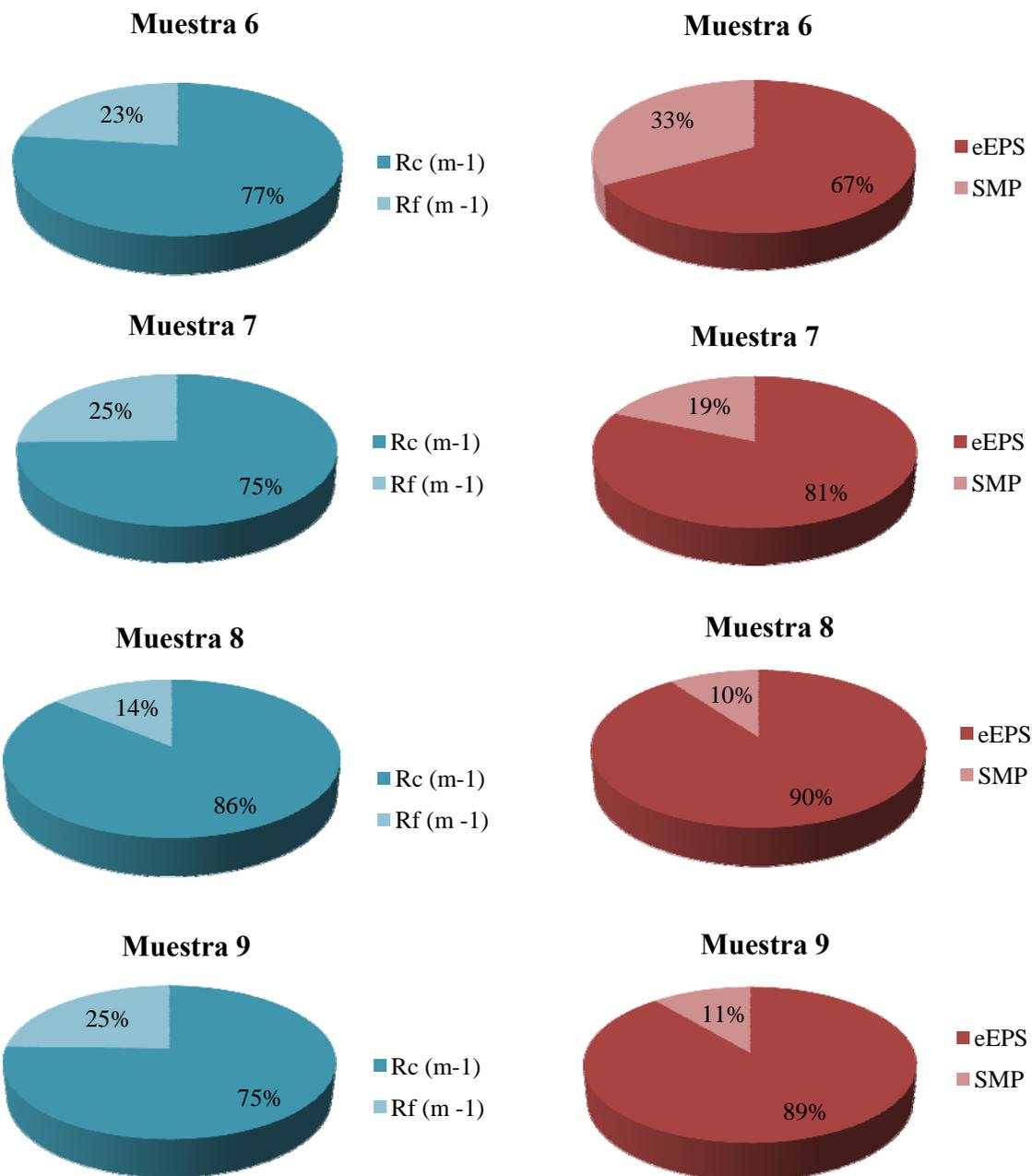


Gráfico 4.20: Relación entre R_f y concentración de SMP

Según muchos autores los SMP son los principales causantes de la resistencia R_f , pero en este caso a la vista de los tres gráficos anteriores se deduce que la concentración de SMP no presenta una clara relación con las resistencias. Esto puede ser debido a que la concentración de SMP contenida en el licor de mezcla es muy pequeña, del orden de 4 – 6 mg/gSSV. Al ser la fracción soluble es más sencillo que sea asimilada por los microorganismos presentes en el licor de mezcla durante la etapa de recepción de la muestra, por lo que es consumida y los valores obtenidos son bajos y no se llega a apreciar la relación. Por lo tanto, se deberían analizar los SMP lo más rápidamente posible, el problema es que dependiendo de la distancia de la depuradora al laboratorio el tiempo está limitado.

A continuación se muestra en el gráfico 4.21 los diagramas circulares de cuatro muestras seleccionadas. Por un lado, se presentan las resistencias R_c y R_f , descartándose la resistencia a la membrana que en todas las muestras se mantiene prácticamente constante por trabajarse siempre con recortes de la misma membrana y por otro lado, las eEPS y SMP presentes en la misma.

Gráfico 4.21: Diagramas circulares de las resistencias y concentraciones de EPS y SMP



Se observa que el ensuciamiento causada por las sustancias retenidas en los poros de la membrana (R_f) es menor que la causada por la formación de la torta (R_c), ya que R_f representa un promedio del 21,7% frente al 78,3% de la R_c . Las eEPS representan el 81,75% de las EPS y los SMP el 18,25%.

En la muestra 6 se observa que cuando la concentración de SMP es elevada (33%) aumenta la resistencia R_f , en la muestra 8 se observa el mismo caso, al disminuir la

concentración de SMP, representa el 10% de las EPS, disminuye también la resistencia R_f a un 14%.

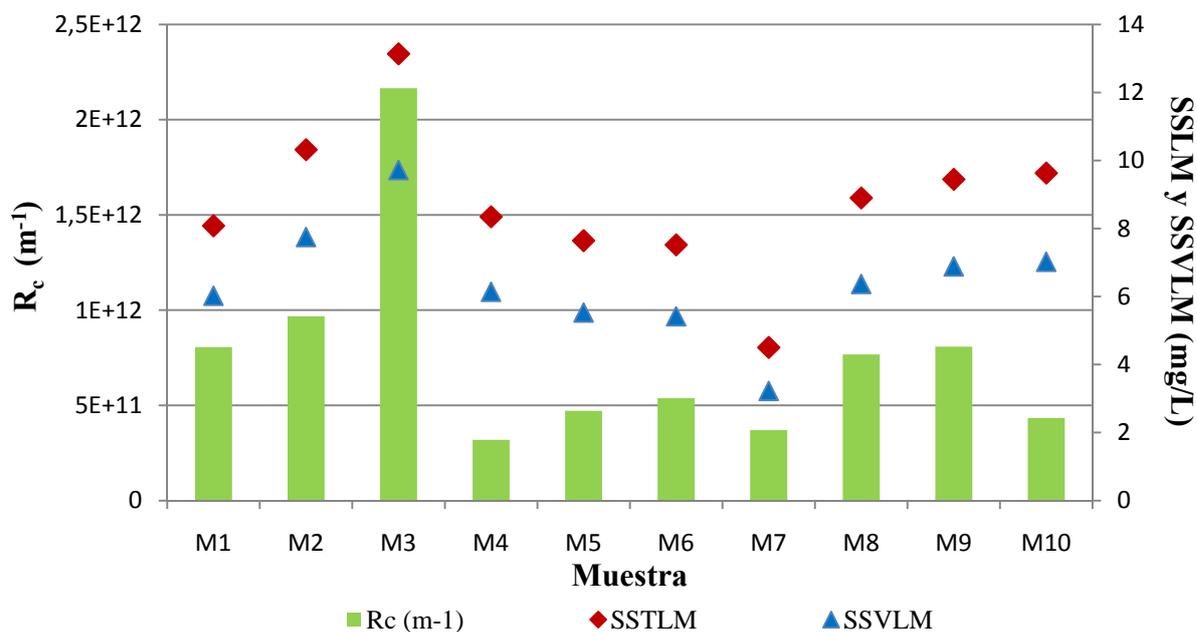
Estos valores permitirían afirmar que, tal y como se encuentra en bibliografía, la resistencia al ensuciamiento R_f se ve más afectada por las SMP y la resistencia debida a la torta está relacionada con la concentración de EPS. Cuando hay más concentración de EPS aumenta la resistencia provocada por la torta.

Sin embargo, esto no se ha cumplido en todas las muestras debido posiblemente a la variabilidad de sustancias en el agua residual de entrada a la EDAR y a las diferentes condiciones de operación del reactor.

4.4.3 INFLUENCIA DE SSLM Y SSVLM EN LAS RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN

En el gráfico 4.22 se correlaciona la resistencia a la torta con la concentración de sólidos presentes en el licor de mezcla.

Gráfico 4.22: Relación entre R_c y sólidos totales y volátiles en el licor de mezcla

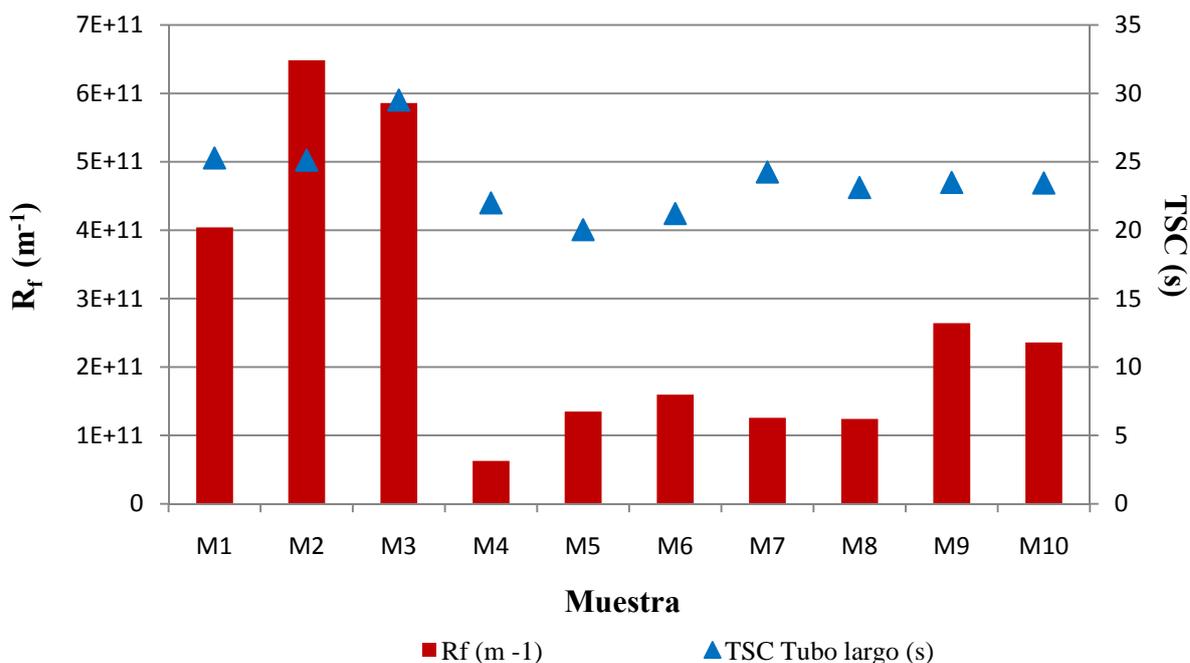


Se observa una relación directa entre R_c y SSLM ó SSVLM. Así, al aumentar la concentración de sólidos, la resistencia a la torta aumenta y al disminuir un parámetro también lo hace el otro. Luego la resistencia debida a la capa de torta formada está muy condicionada por la concentración de sólidos presentes en el fango.

4.4.4 INFLUENCIA DEL TSC EN LAS RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN

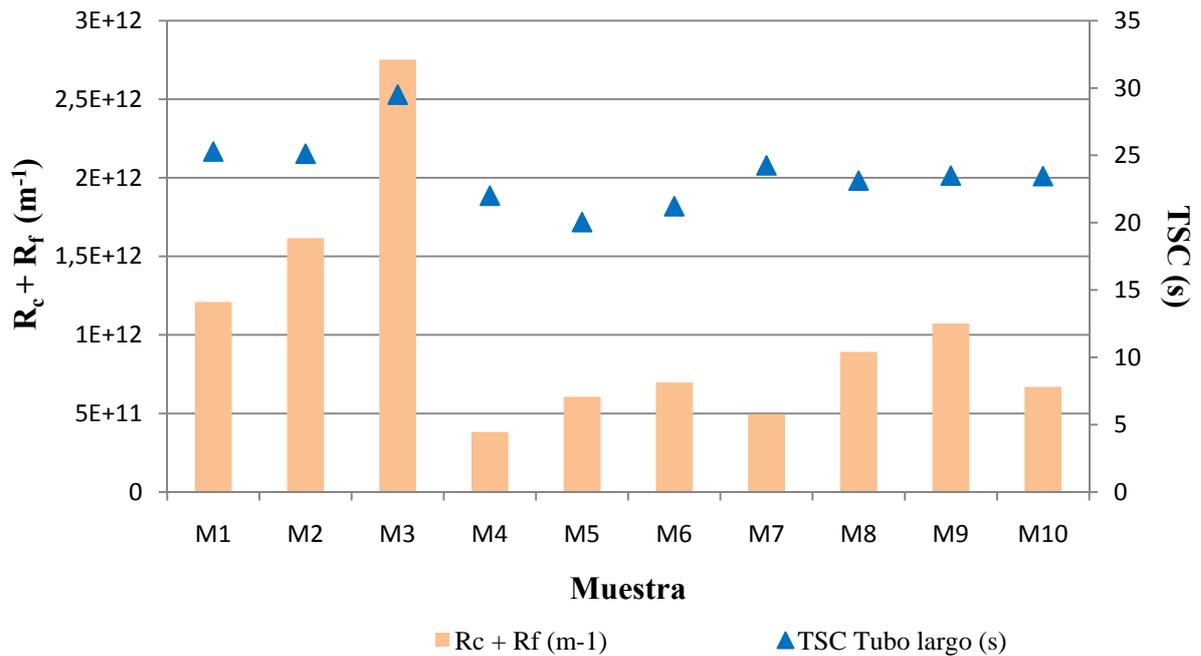
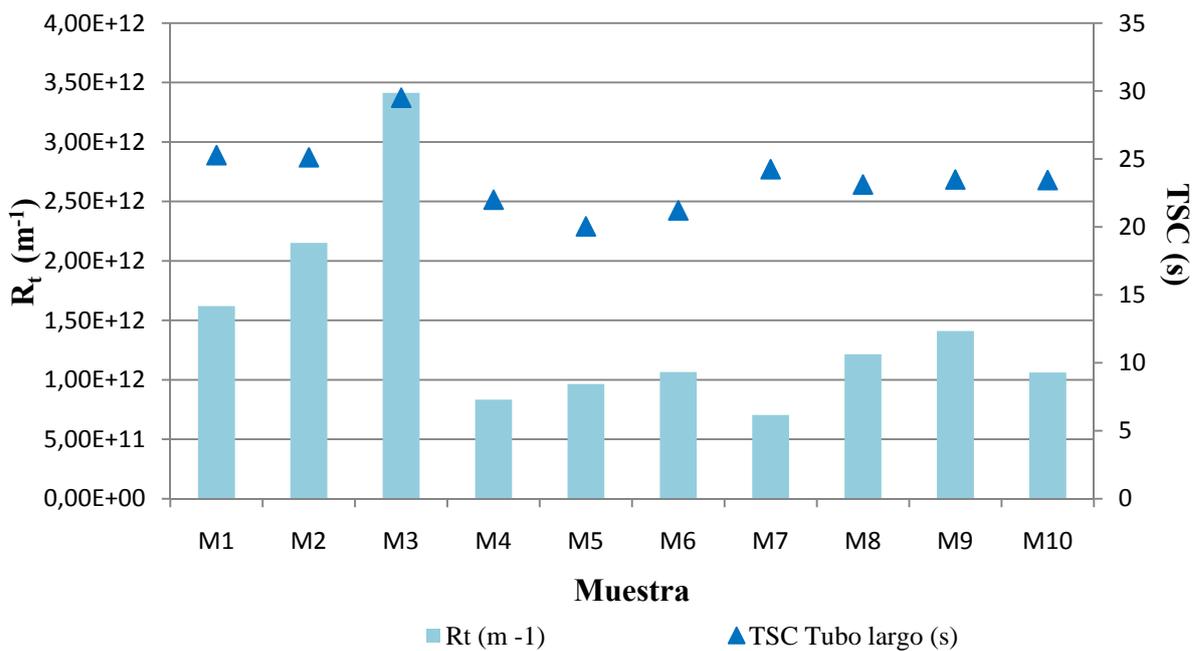
En el gráfico 4.23 se muestra la resistencia al ensuciamiento con el tiempo de succión capilar de tubo largo, es decir, filtrado lento. Se decide representar los datos frente a este tipo de filtrado porque es más representativo en nuestro caso que el filtrado rápido.

Gráfico 4.23: Relación entre R_f y tiempo de succión capilar



Se observa que al producirse una disminución del TSC, también disminuye la resistencia R_f , es decir cuanto menor resistencia hay más deshidratable es el fango como cabía esperar.

En el gráfico 4.24 se representa el tiempo de succión capilar junto con la suma de las resistencias debidas a R_c y R_f , las cuales representan el ensuciamiento debido al paso del licor de mezcla. Por último, en el gráfico 4.25 el TSC con la resistencia total de la membrana. Las conclusiones obtenidas son las mismas que las expuestas con R_f .

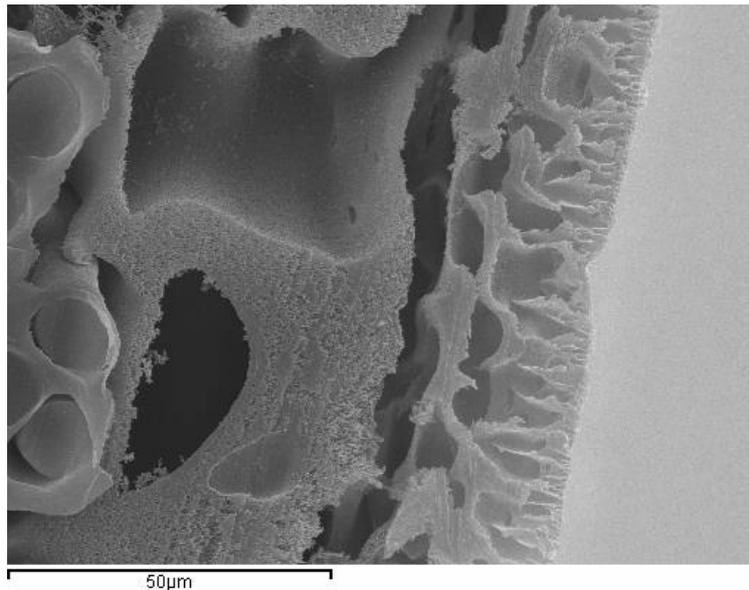
Gráfico 4.24: Relación entre $R_c + R_f$ y el tiempo de succión capilarGráfico 4.25: Relación entre R_t y el tiempo de succión capilar

En ambos gráficos se observa una ligera tendencia a aumentar el TSC cuanto aumentan las resistencias, al igual que sucedía en el caso de la resistencia a R_f .

4.5 MICROSCOPIO SEM Y AFM

En el apartado 3.5.3 se ha explicado la metodología a seguir para la observación de las muestras en el microscopio electrónico de barrido y en el microscopio de fuerza atómica. A continuación se muestran las imágenes obtenidas en estos tipos de microscopios con la membrana de UF ensayada en la planta piloto. La figura 4.1 muestra un corte de la membrana orgánica.

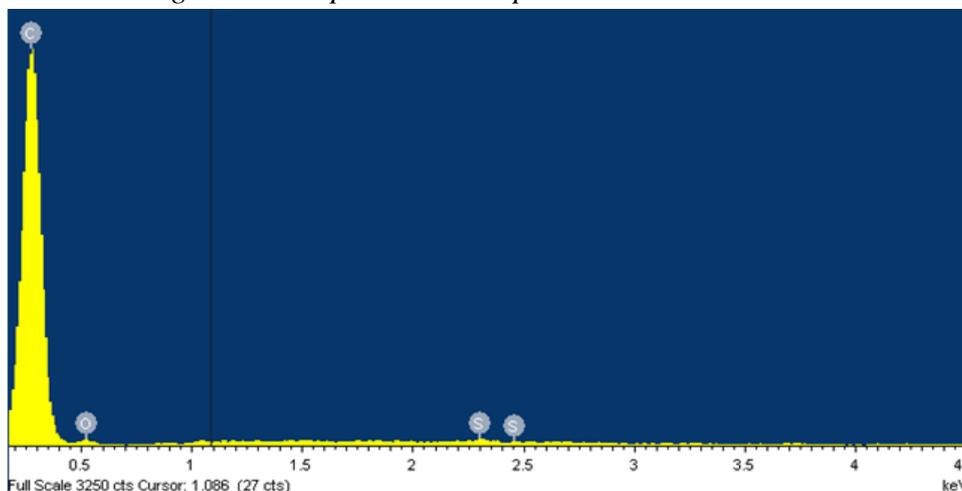
Figura 4.1: Imagen de la membrana en el microscopio SEM x2.700



En la parte derecha de la imagen se puede observar una fina capa microporosa que corresponde a la capa activa (de PES) y que se apoya sobre una estructura macroporosa que es la capa soporte (de poliéster). La imagen fue tomada a 2.700 aumentos.

El microscopio SEM además permite realizar un microanálisis de la composición de la membrana, ofreciendo un espectro de composición del material tal y como se observa en la figura 4.2.

Figura 4.2: Espectro de composición de la membrana



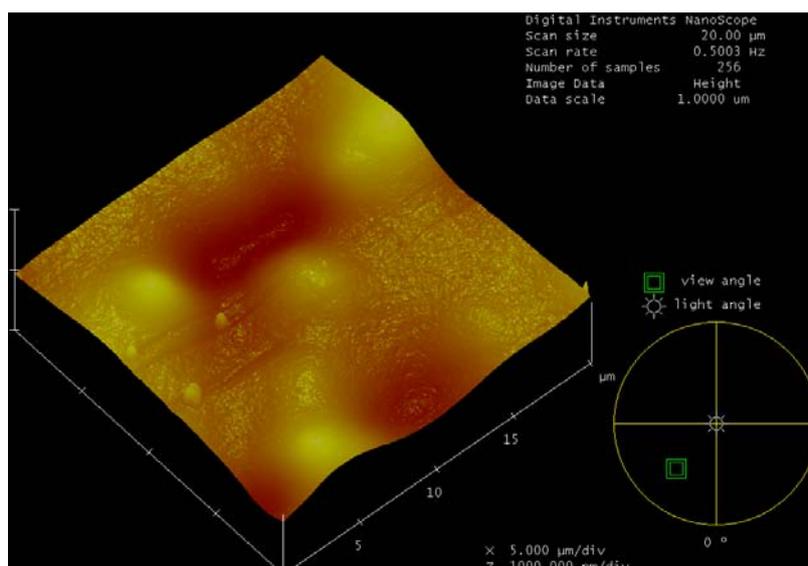
Los resultados derivados del microanálisis corroboran la naturaleza orgánica de la membrana. Cabe añadir que los elementos de peso atómico inferior al carbono no aparecen reflejados en el microanálisis. Faltaría pues el porcentaje equivalente del hidrógeno. Lo que sí que refleja el microanálisis es la ausencia de metales intrusos en la composición.

Tabla 4.4: Microanálisis de la membrana

Elemento	% peso	% atómico
C	94,03	95,54
O	5,72	4,36
S	0,26	0,1

En la figura 4.3 se muestra una imagen de la membrana obtenida con el microscopio de fuerza atómica.

Figura 4.3: Imagen del microscopio AFM



En este caso la superficie escaneada es de 20 μm y la rugosidad superficial medida es de 69,195 nm.

La estructura de la membrana se aprecia mejor por medio de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido. Esta es una técnica que proporciona información visual directa de la superficie de la membrana así como de la morfología de la sección de la misma.

4.6 MICROSCOPIO ÓPTICO

La observación al microscopio óptico de las muestras del fango activo del biorreactor de membranas nos da la información sobre el estado del proceso de depuración.

Los protozoos y metazoos (rotíferos) desempeñan un papel especial en la eliminación de materia orgánica suspendida, controlando la concentración y producción de fango dada su función depredadora de bacterias. Especies superiores como los nemátodos pueden contribuir al consumo de materia orgánica particulada.

A continuación (Fig. 4.5) se observan algunas fotografías del licor de mezcla de las que se pueden deducir las características principales del mismo. Como se observa, los flóculos son más pequeños que en un proceso de fangos activos convencional, esto es debido a la turbulencia creada con la aireación. Son flóculos con estructura abierta y compacta. Se observa también la presencia de microorganismos característicos de edades del fango elevadas, como pueden ser los rotíferos y anélidos, aunque la presencia de microorganismos en general es bastante escasa.

En las figuras 4.5 – 4.8 se presentan los microorganismos observados.

Figura 4.5: Metazoos presentes en el licor de mezcla, rotíferos



Rotaria sp. con ameba 100x



Cephalodella sp 100x

Figura 4.6: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas

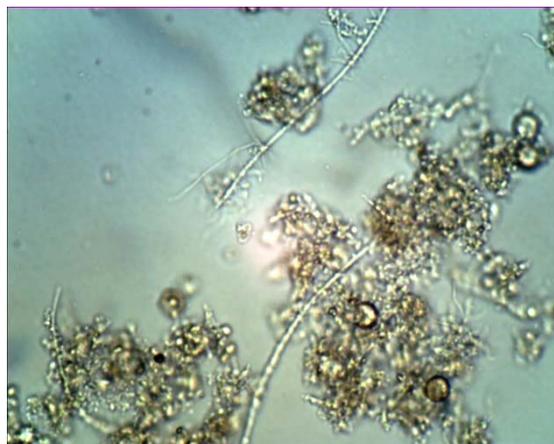
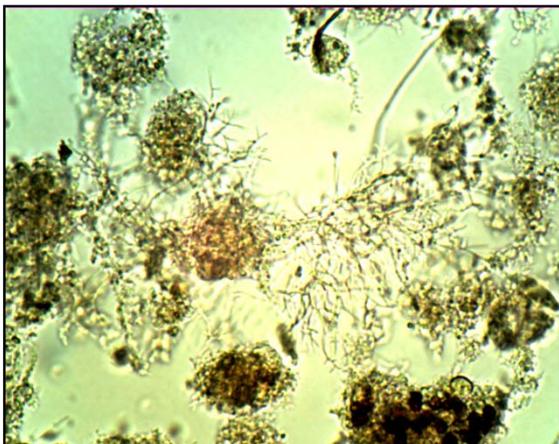
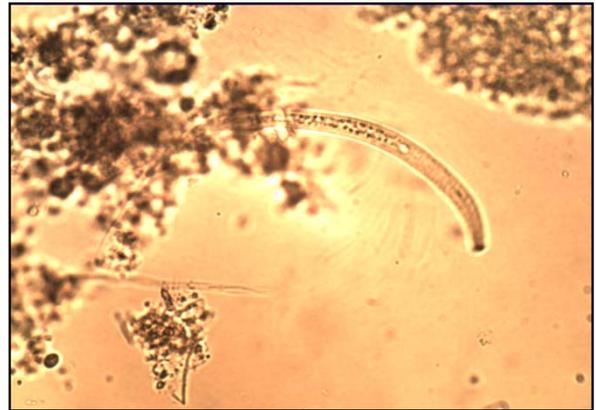


Figura 4.7: Metazoos presentes en el licor de mezcla, rotífero y nemátodo

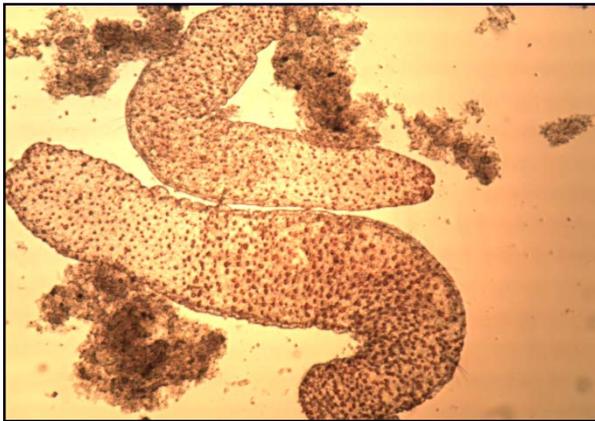


Lecane sp.100x



Nemátodo 100x

Figura 4.8: Metazoos presentes en el licor de mezcla, anélidos



Aelosoma Variegatum 100x



Aelosoma Variegatum100x

Figura 4.9: Protozoos presentes en el licor de mezcla, peritricos



Vorticellas 100x

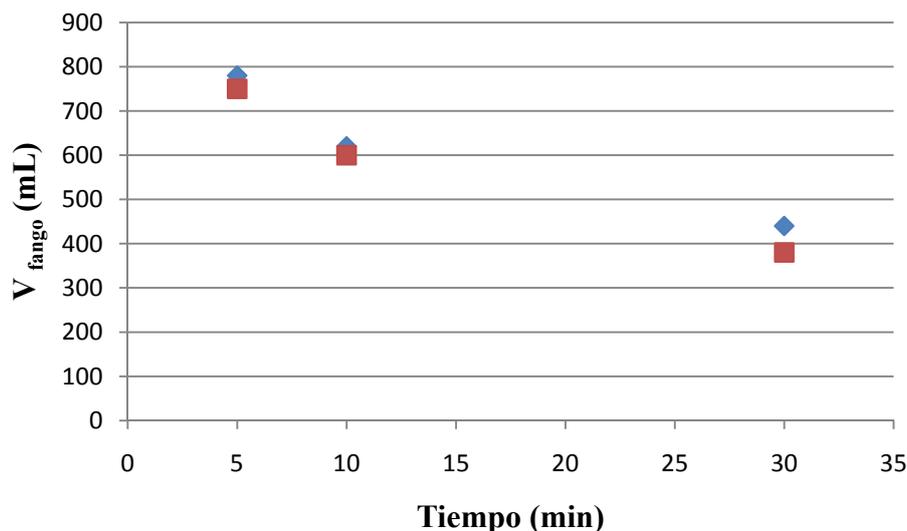


Vorticellas 100x

4.7 ANÁLISIS DE LA SEDIMENTABILIDAD DEL FANGO (V_{30})

El análisis de la sedimentabilidad del fango se realizó tomando datos a los 5, 10 y 30 minutos, obteniéndose el resultado de dos analíticas de dos muestras distintas en la gráfica 4.26.

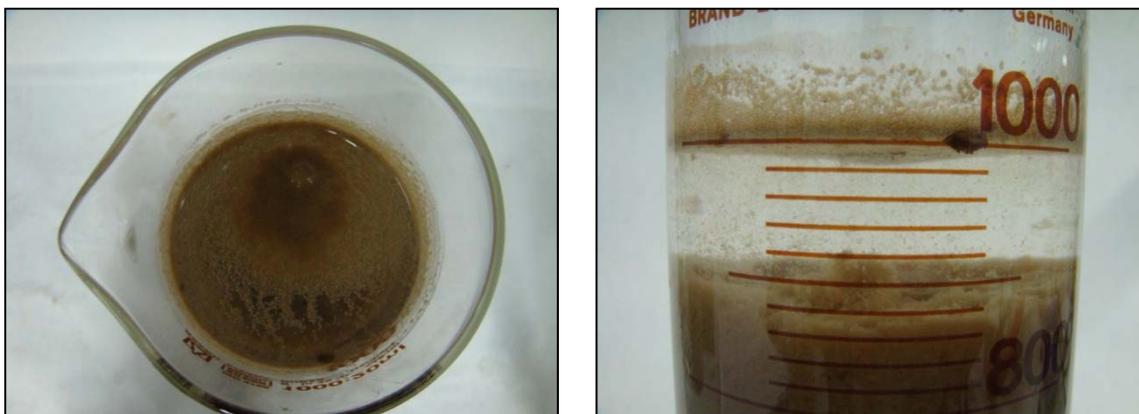
Gráfica 4.26: Resultados del ensayo de la V_{30}



Se observa que son muy similares los valores obtenidos en las dos ocasiones, los cuales son bastante elevados debido a la elevada concentración de SSLM con las que opera el BRM (8.900 y 9.400 mg/L).

Cabe destacar la formación de una capa cerosa en la superficie, debido a la presencia de bacterias filamentosas en el licor de mezcla (Fig. 4.9).

Figura 4.10: Fotografías de la V_{30} , capa cerosa y transparencia del sobrenadante



El sobrenadante es bastante transparente aunque se observan partículas coloidales que se separarán en las membranas, por lo que no afectarán a la calidad del efluente.

5. CONCLUSIONES

A continuación se exponen las principales conclusiones que se pueden obtener de este trabajo:

- Del estudio de conservación de las muestras se ha obtenido que el modo de transporte refrigerado de las muestras refleja con mayor realidad las características del licor de mezcla presente en el reactor, ya que se obtienen mayor cantidad de SMP y eEPS y, además, minimiza la influencia de la temperatura estacional.
- El método de extracción con la resina de intercambio iónico CER, aplicando dos etapas, es del que mejores resultados se obtienen, ya que extrae mayor concentración de proteínas y a su vez, extrae una concentración de ADN menor. La concentración promedio de proteínas obtenida con este método CER es de 22,7 mgBSA/gSSV y la de carbohidratos de 3,79 mgGlucosa/gSSV, extrayéndose sólo una concentración de ADN de 11,571 µg/mL.
- El método de extracción con Triton X-100 es el más agresivo, al obtener las mayores concentraciones de proteínas, carbohidratos y ADN. Concluimos que parte de las proteínas y carbohidratos analizadas corresponden al material extraído del interior de las células.
- El método de adición estándar ha demostrado la existencia de interferencias entre el método de extracción 0,5% Triton X-100 y algunos métodos analíticos. En el caso de las proteínas el detergente interfiere con el método de Lowry y en el de los carbohidratos con el método de la antrona. Sin embargo, no se encontraron interferencias de este procedimiento de extracción con el método BCA para la determinación de proteínas y el método de Dubois para la determinación de carbohidratos.
- Para el resto de procedimientos de extracción, se seleccionó el método BCA para análisis de proteínas y el método de la antrona para el análisis de carbohidratos.
- Existe una relación entre los sólidos en suspensión totales y volátiles presentes en el licor de mezcla y la resistencia a la torta formada sobre la superficie de la membrana, ya que a medida que aumentan los SSLM y SSVLM, aumenta Rc. Sin embargo, esta tendencia no se encontró con Rf.
- El ensuciamiento causado por las partículas coloidales (Rf) es menor que el causado por la formación de la torta (Rc), 21,7% y 78,3% respectivamente. Estos resultados concuerdan con las concentraciones obtenidas tanto para las

proteínas como los carbohidratos. Así, los valores medios de proteínas (22,7mgBSA/gSSV) y carbohidratos (3,79 mgGlucosa/gSSV).

- Los resultados obtenidos muestran que las EPS tienen mayor influencia en la resistencia debida a la formación de la torta, R_c , mientras que los SMP influyen más sobre la resistencia R_f .
- El tiempo de succión capilar es un parámetro adecuado para caracterizar el licor de mezcla de un BRM, los valores encontrados para tubo largo son entre 20 y 25s.
- El examen microscópico del licor de mezcla realizado durante todo el periodo experimental, reveló que las muestras de licor de mezcla atendían a las características de un BRM en el cual los flóculos son pequeños y de forma irregular, debido a la turbulencia generada en la aireación. Destacamos de la microfauna de protozoos observada la presencia de vorticellas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed Z., Cho J., Lim B.R, Song K.G., Ahn K.H. Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science* 287 (2007) 211–218.
- Bae T.H., Tak T.M. Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor. *Journal of Membrane Science* 264 (2005) 151–160.
- Bina Z., Baosheng S., Min J., Taishi G, Zhenghong G. Extraction and analysis of extracellular polymeric substances in membrane fouling in submerged MBR. *Desalination* 227 (2008) 286–294.
- Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30 (1996) 1749-1758.
- Gander M.A, Jefferson B., Judd S.J. Membrane bioreactors for use in small wastewater treatment plants; membrane materials and effluent quality. *Water Science and Technology* 41 (2000) 205-211.
- Gerhardt P., Wood W.A, Krieg N., Murray R. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM Press (1994).
- Gessesse A., Dueholm T., Petersen S.B., Nielsen P.H. Lipase and protease extraction from activated sludge. *Water Research* 37 (2003) 3652–3657.
- Holme D.J., Peck H. *Bioquímica analítica*. Ed. Acribia S.A. (1983).
- Jefferson B., Laine A.T, Judd S.J, Stephenson T. Membrane bioreactors and their role in wastewater reuse. *Water Science and Technology* 41 (2000) 197-204.
- Judd S. *The MBR Book. Principles and applications of membrane bioreactors in water and wastewater treatment*. Ed: Elsevier (2007).
- Lapidou C.S, Rittmann B.E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* 36 (2002) 2711–2720.
- Le-Clech P., Chen V., Fane T. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science* 284 (2006) 17–53.
- Liu H., Herbert H.P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology* 95 (2002) 249–256.

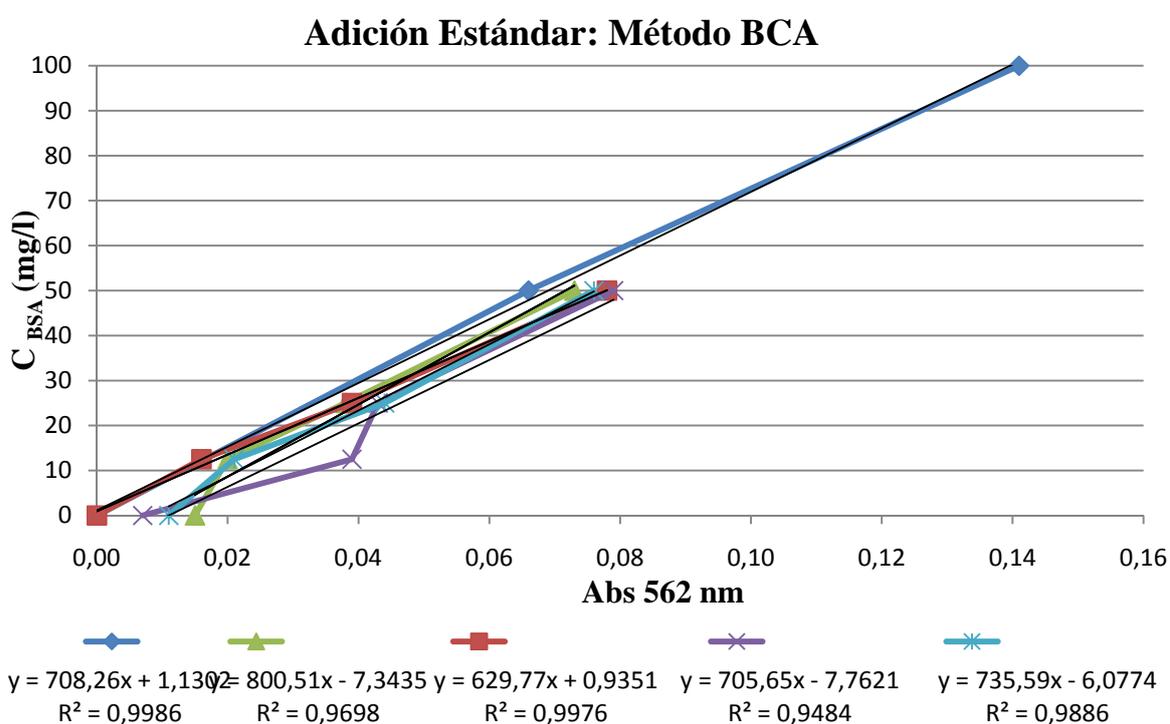
- Meng F., Chae S.R., Drews A., Kraume M., Shin H.S., Yang F. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Research* 43 (2009) 1489 – 1512.
 - Meng F., Zhang H., Yang F., Li Y., Xiao J., Zhang X. Effect of filamentous bacteria on membrane fouling in submerged membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science* 272 (2006) 161–168.
 - Meng F., Zhang H., Yang F., Zhang S., Li Y., Zhang X. Identification of activated sludge properties affecting membrane fouling in submerged membrane bioreactors. *Separation and Purification Technology* 51 (2006) 95–103.
 - Metcalf & Eddy. *Wastewater engineering: Treatment, disposal, and reuse*. (2003). Ed: McGraw-Hill
 - Metzger U., Le-Clech P., Stuetz R.M, Frimmel F.H., Chen V. Characterisation of polymeric fouling in membrane bioreactors and the effect of different filtration modes. *Journal of Membrane Science* 301 (2007) 180–189.
 - Monique R. Etienne P., Dominique L. A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. *Bioresource Technology* 99 (2008) 7464–7471.
 - Nagaoka H., Akoh H. Decomposition of EPS on the membrane surface and its influence on the fouling mechanism in MBRs. *Desalination* 231 (2008) 150–155.
 - Ras M., Girbal-Neuhauser E., Paul E., Spérandio M., Lefebvre D. Protein extraction from activated sludge: An analytical approach. *Water Research* 42 (2008) 1867–1878.
 - Rosenberger S., Kraume M. Filterability of activated sludge in membrane bioreactors. *Desalination* 151 (2002) 195-200.
 - Rosenberger S., Laabs C., Lesjean B., Gnirss R., Amy G., Jekel M., Schrotter J.C. Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Research* 40 (2006) 710–720.
 - Wingender J., Neu T., Flemming H. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Ed: Springer-Verlag (1999).
- Yang W., Cicek N., Ilg J. State of the art of membrane biorreactors: worldwide research and commercial applications in North America. *Journal of Membrane Science* 270 (2006) 201-211.

ANEXO

En este Anexo, se muestra el procedimiento seguido en el análisis de datos de una muestra, en concreto son los datos de la muestra MC en los que se observan los análisis realizados tanto al licor de mezcla del BRM como del proceso convencional. Estas mismas tablas y gráficas se han realizado para cada una de las muestras analizadas.

SSV MBR (g/l)	7,696	Factor Dil MBR	7,696
SSV CONV (g/l)	1,880	Factor Dil CONV	1,880

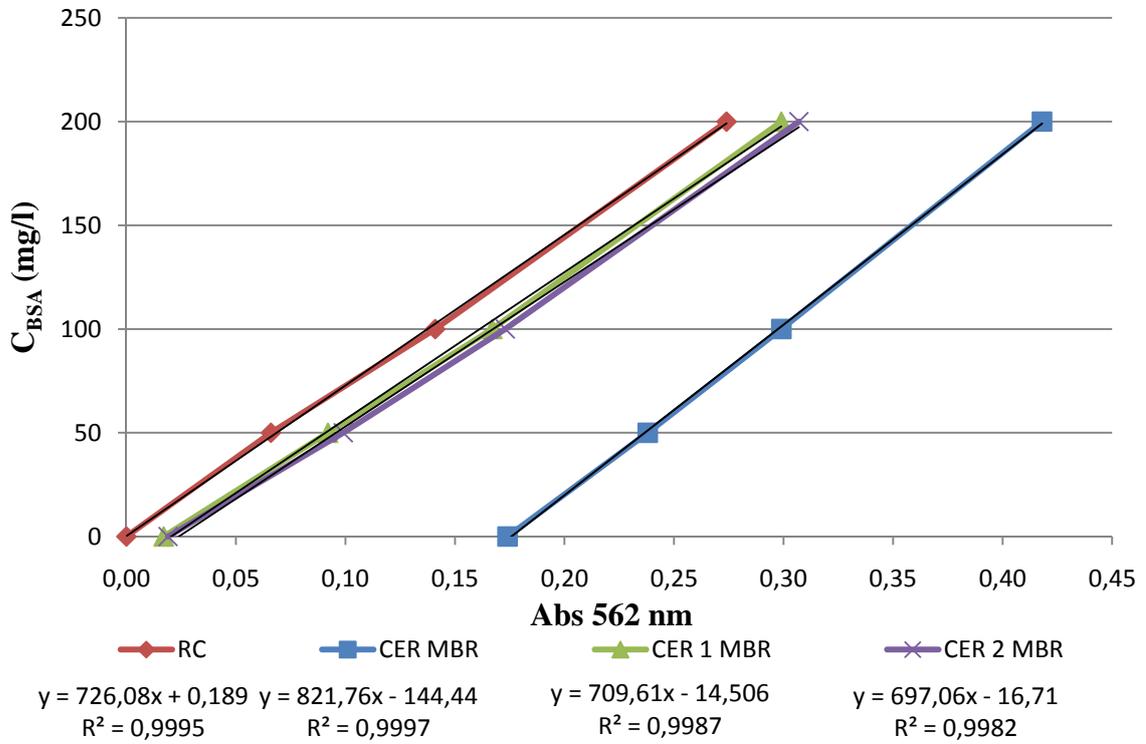
MÉTODO BCA



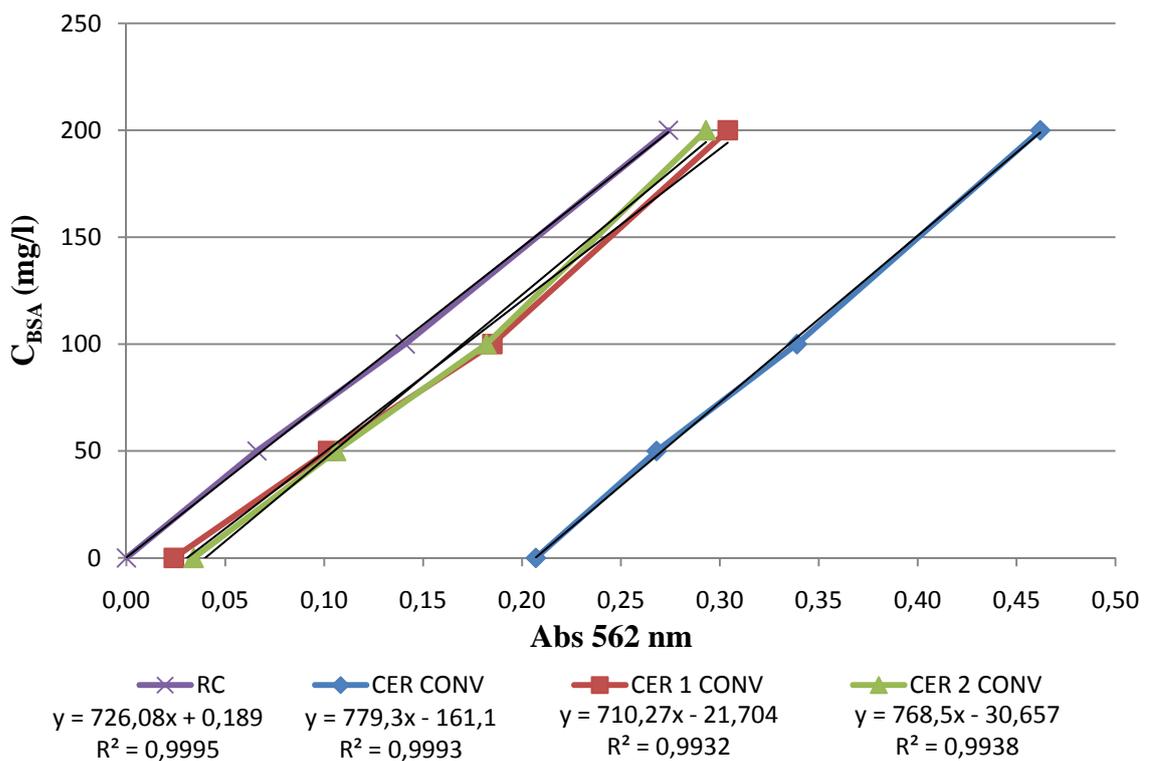
	Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	mg eq BSA/g SSV
MBR	14,686	23,506	8,212	1,908
MBR Dil	14,392	17,393	37,765	1,870
CONV	15,524	12,175	9,983	8,257
CONV Dil	22,850	33,540	19,433	12,154

MÉTODO BCA

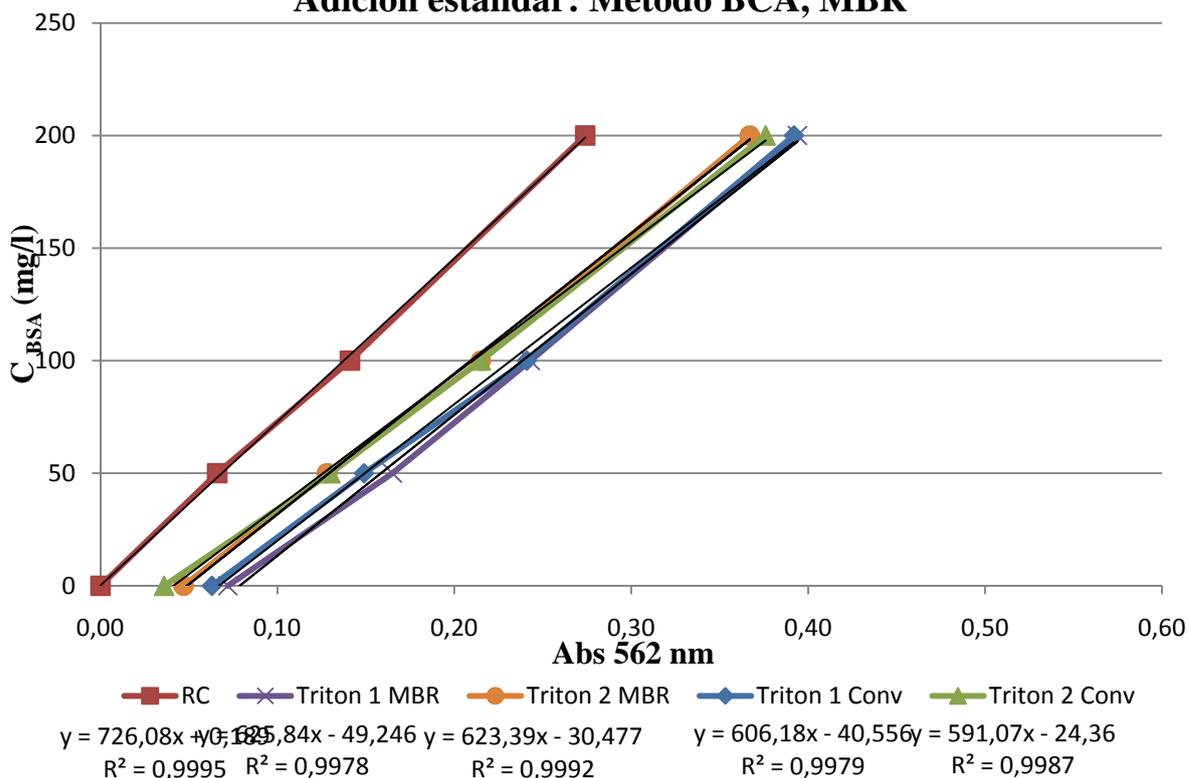
Adición estándar: Método BCA



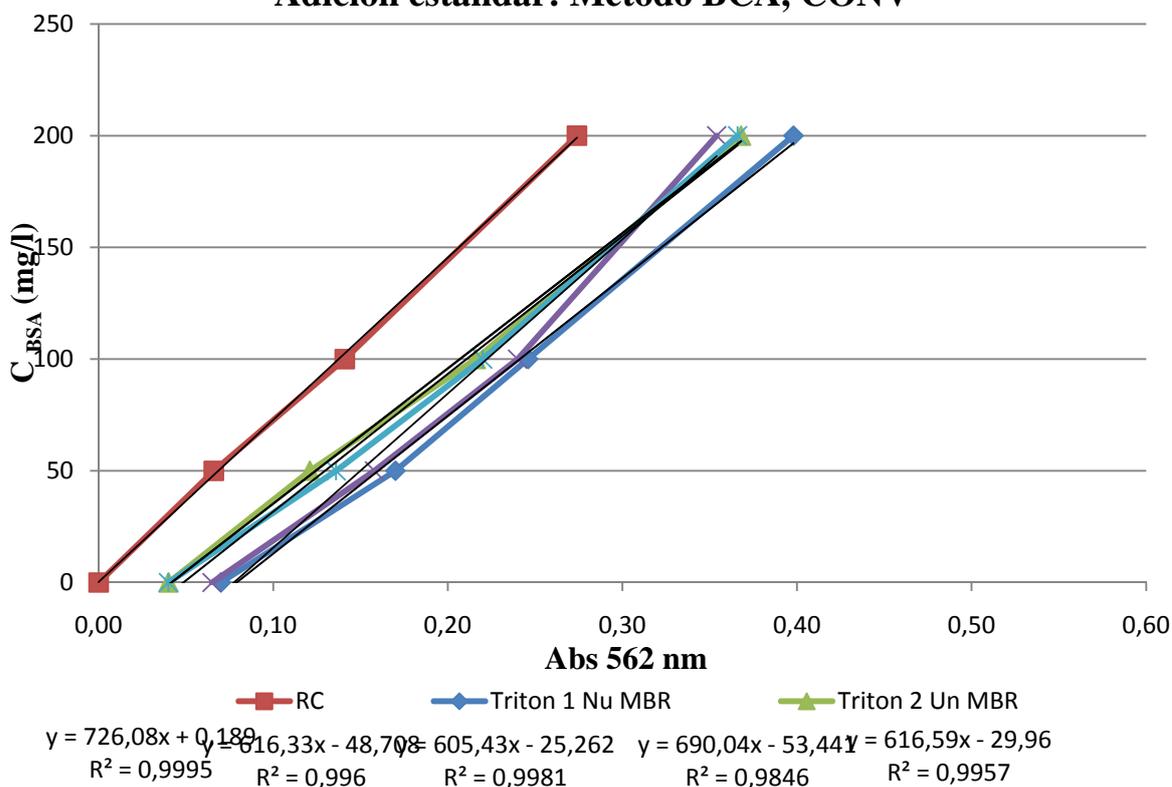
Adición estándar: Método BCA



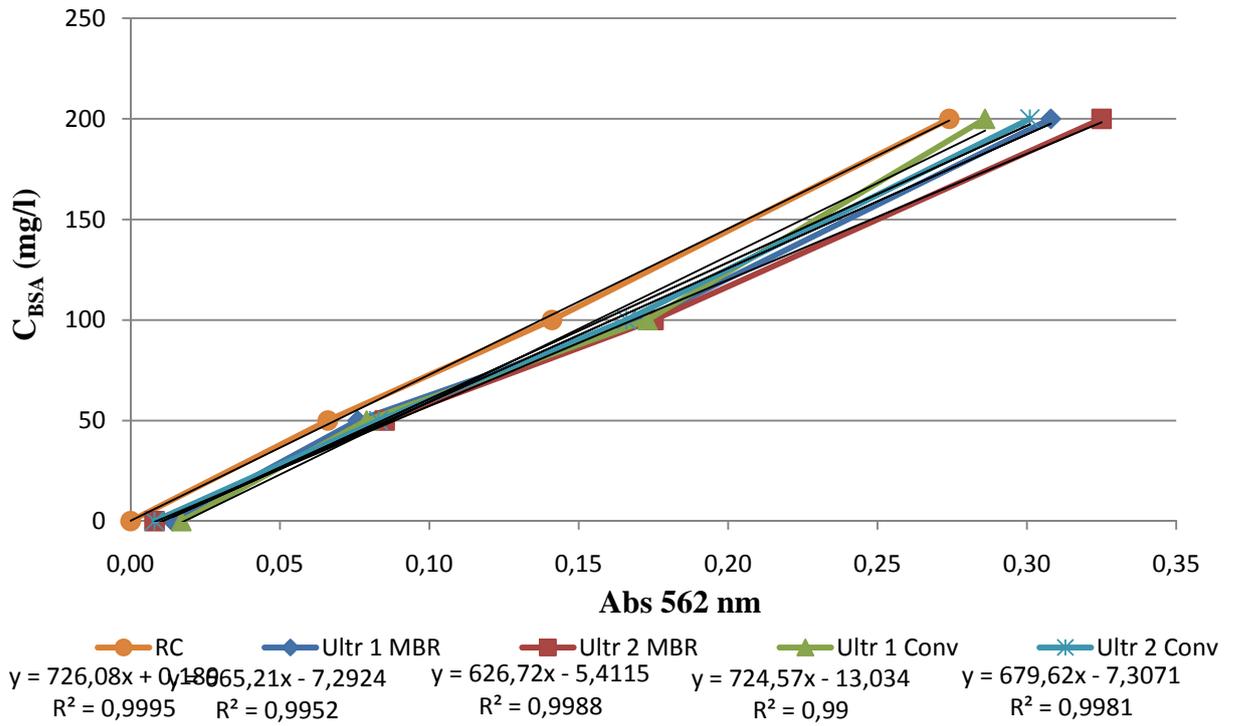
Adición estándar: Método BCA, MBR



Adición estándar: Método BCA, CONV



Adición estándar: Método BCA



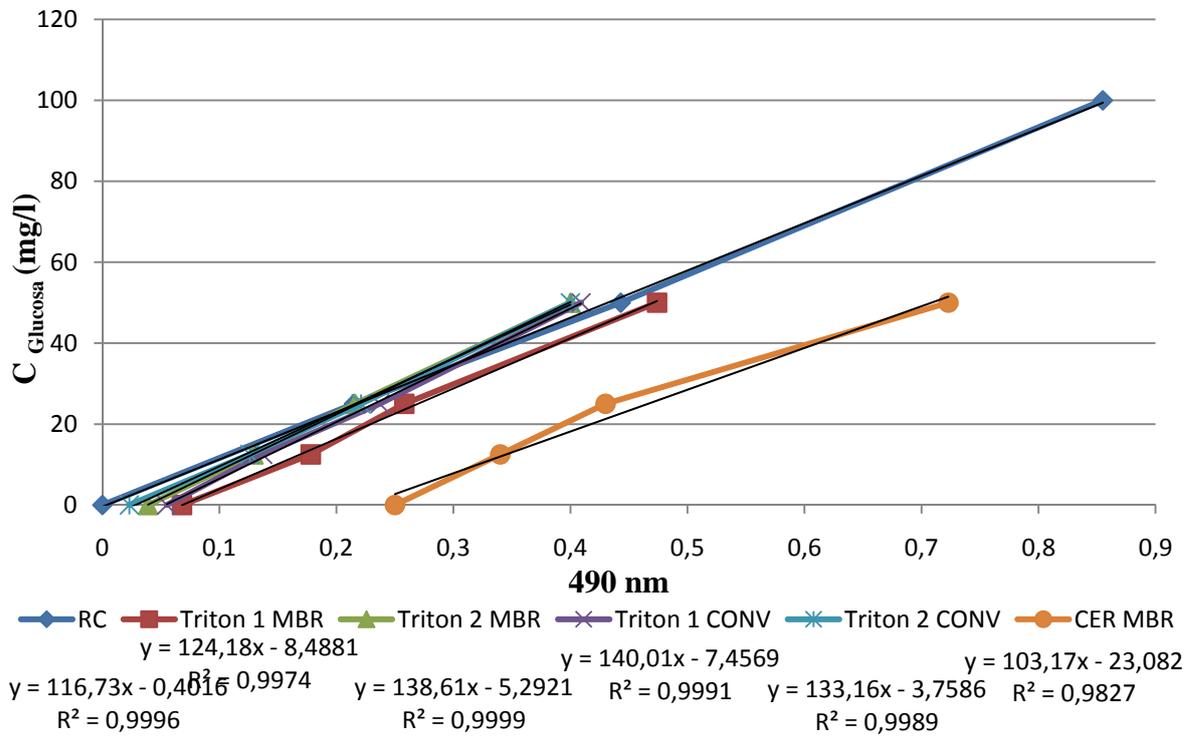
		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
MBR	CER	288,8	253,026	258,282	288,8	37,526
	CER 1	223,184	192,877	169,073	480,384	62,420
	CER 2	257,200	215,226	247,296		
CONV	CER	322,2	300,942	272,681	322,2	171,383
	CER 1	81,592	66,225	63,595	196,836	104,700
	CER 2	115,244	93,522	78,608		

		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
MBR	Triton 1	757,902	807,480	798,575	1226,896	159,420
	Triton 2	468,994	528,115	401,877		
CONV	Triton 1	152,468	172,686	160,501	244,062	129,820
	Triton 2	91,594	98,982	94,077		
MBR Nuevo	Triton 1	749,590	785,131	240,119	1138,392	147,920
	Triton 2	388,802	449,893	121,830		
CONV Nuevo	Triton 1	200,934	178,145	485,920	313,584	166,800
	Triton 2	112,650	109,901	307,614		

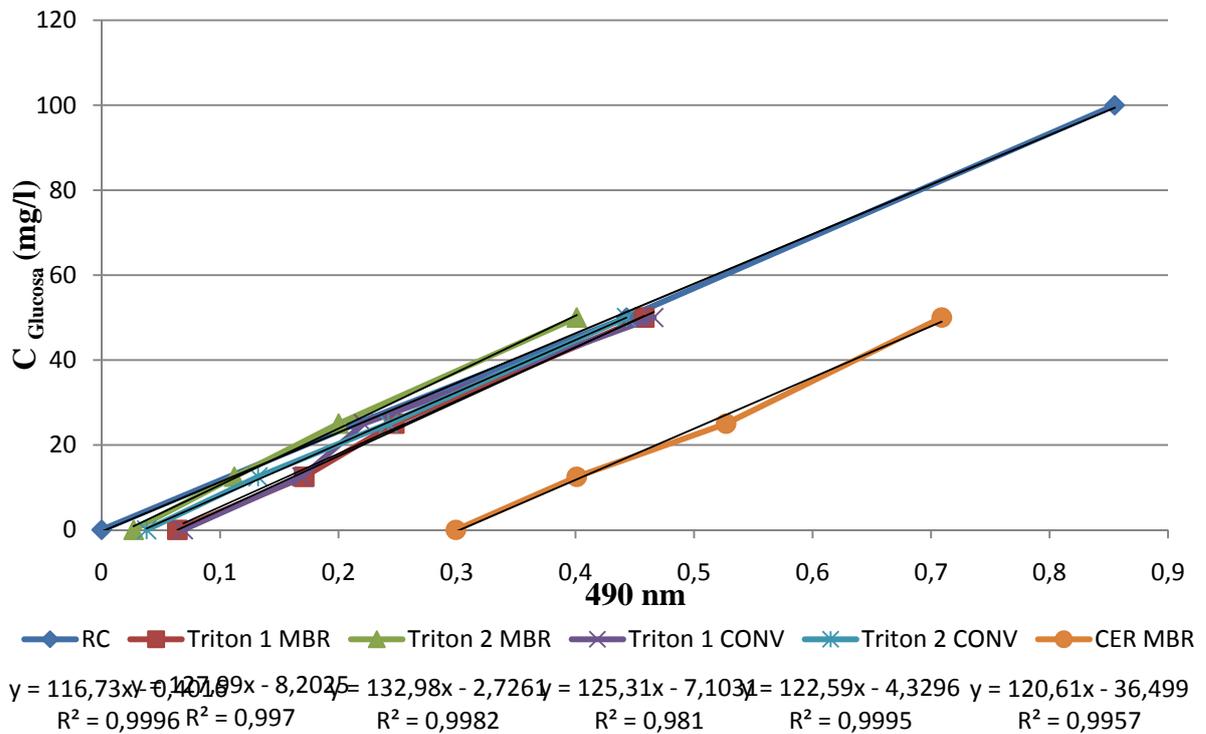
		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
MBR	Ultr 1	119,814	159,353	83,402	203,100	26,390
	Ultr 2	83,286	92,306	83,402		
CONV	Ultr 1	48,993	47,117	23,558	76,467	40,67
	Ultr 2	27,474	22,549	16,279		

MÉTODO DUBOIS

Adición Estándar: Método Dubois



Adición Estándar: Método Dubois



		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
MBR	Triton 1	130,647	115,973	104,689	212,102	27,560
	Triton 2	81,454	63,881	47,658		
CONV	Triton 1	28,035	22,626	20,637	42,165	22,428
	Triton 2	14,130	8,584	10,545		
MBR	CER	355,247	442,889	475,614	355,247	46,16

		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
MBR	Triton 1 Nu	126,245	108,788	102,892	168,204	21,856
	Triton 2 Nu	41,959	42,326	29,246		
CONV	Triton 1 Nu	26,707	28,769	25,574	42,984	22,864
	Triton 2 Nu	16,277	15,166	15,372		
CONV	CER	137,202	129,691	130,884	137,202	72,98

MÉTODO ANTRONA

		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
MBR	CER	40,9	49,29	49,5	40,9	5,314
	CER 1	11,775	14,930	26,705	11,775	1,53
	CER 2	-	33,478	29,399		
	Ultr 1	13,545	11,544	14,007	23,088	3
	Ultr 2	9,543	11,544	9,158		
	SMP Dil	3,848	22,6262	13,0832	3,848	0,500
	SMP	1,76	5,05	4,05	1,76	0,229

		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
CONV	CER	49,39	48,46	48,25	49,390	26,271
	CER 1	8,422	10,528	10,133	17,973	9,560
	CER 2	9,550	11,543	10,641		
	Ultr 1	10,208	5,640	7,144	13,310	7,1
	Ultr 2	3,102	1,824	2,820		
	SMP Dil	4,963	6,411	3,869	4,963	2,640
	SMP	0,31	3,17	2,76	0,31	0,16

MÉTODO LOWRY

		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
MBR	CER	368,3	285,4	222,8	368,3	47,856
	CER 1	462,760	464,838	438,672	1024,568	133,13
	CER 2	561,808	497,931	482,539		
	Ultr 1	377,104	384,800	397,883	838,864	109
	Ultr 2	461,760	367,869	383,261		
	SMP Dil	411,736	354,016	333,237	411,736	54
	SMP	23,5	9,6	8,7	23,5	3,054

		Adición Estándar	50 % muestra	100 % muestra	TOTAL	mg eq BSA/ g SSV
CONV	CER	491	296	249	491	261,170
	CER 1	112,800	92,120	94,564	276,360	147,0
	CER 2	163,560	125,960	145,700		
	Ultr 1	97,760	96,820	89,300	210,560	112,0
	Ultr 2	112,800	94,000	85,916		
	SMP Dil	45,327	47,808	22,823	45,327	24
	SMP	18,19	10,43	6,42	18,2	9,676

ADN

EXTRACCIÓN	REACTOR	ADN BR (2-1000 ng) (µg/ml)			MEDIA	(µg/ml)
Ultr 1	MBR	0,012	<0,010	<0,010	0,0120	1,8470
Ultr 2		0,0215	0,0155	0,0163	0,0178	2,7346
Ultr 1	CONV	<0,010	0,0147	-	0,0147	0,5527
Ultr 2		0,0158	0,0112	0,0102	0,0124	0,4662
Triton 1	MBR	0,291	0,238	0,226	0,2517	38,7365
Triton 2		0,123	0,116	0,112	0,1170	18,0086
Triton 1	CONV	0,132	0,128	0,134	0,1313	4,9381
Triton 2		0,0906	0,0798	0,0978	0,0894	3,3614
Triton 1 Nu	MBR	0,189	0,198	0,202	0,1963	30,2196
Triton 2 Nu		0,0879	0,114	0,103	0,1016	15,6434
Triton 1 Nu	CONV	0,166	0,188	0,202	0,1853	6,9685
Triton 2 Nu		0,1	0,121	0,116	0,1123	4,2237
CER	MBR	1,37	1,21	1,53	1,3700	27,4000
CER	CONV	0,946	0,912	0,906	0,9213	18,4267
CER 1	MBR	0,0578	0,0619	0,0591	0,0596	9,1736
CER 2		0,223	0,223	0,216	0,2207	33,9650
CER 1	CONV	0,147	0,149	0,119	0,1383	5,2013
CER 2		0,1	0,109	0,0988	0,1026	3,8578
SMP	MBR	0,0262	0,0284	-	0,0273	0,5460
SMP	CONV	0,0167	0,0143	-	0,0155	0,3100

EXTRACCIÓN	REACTOR	ADN HS (0,2-100 ng) (ng/ml)			MEDIA	(ng/ml)	(µg/ml)
Ultr 1	MBR	8,68	8,85	8,62	8,717	1341,669	1,342
Ultr 2		13,4	13,5	13,1	13,333	2052,267	2,052
Ultr 1	CONV	8,04	8,28	8,38	8,233	309,573	0,310
Ultr 2		8,44	8,38	8,5	8,440	317,344	0,317
SMP	MBR	12	10,6	11	11,200	1723,904	1,724
SMP Diluido		3,67	3,81	3,64	3,707	570,530	0,571
SMP	CONV	5,8	5,93	6,42	6,050	227,480	0,227
SMP Diluido		2,73	2,82	2,98	2,843	106,909	0,107
Triton 2	MBR	69,9	72,8	-	71,35	10982,192	10,982
Triton 2	CONV	45	46,3	-	45,65	1716,440	1,716
Triton 2 Nu	MBR	51,5	54,2	-	52,85	8134,672	8,135
Triton 2 Nu	CONV	55,3	53,3	-	54,30	2041,680	2,042
CER 1	MBR	50,6	50,4	-	50,50	7772,960	7,773
CER 1	CONV	103	86,9	-	94,95	3570,120	3,570
CER 2		86,3	83,5	-	84,90	3192,240	3,192