



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Evaluación del proceso de nitrificación en un sistema de fangos activados mediante técnicas respirométricas y su relación con bioindicadores y variables de proceso

Trabajo fin de Máster en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente

Intensificación en tratamientos de aguas

Autor:

JEISSON ALEJANDRO PÉREZ MUÑOZ

Director:

Dr. DANIEL AGUADO GARCÍA

Codirector:

Dr. ANDRÉS ZORNOZA ZORNOZA

PAULA BARBARROJA ORTIZ

Septiembre, 2018



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

máster en ingeniería
hidráulica y medio ambiente
mihma

AGRADECIMIENTOS

A los profesores del máster, que durante el transcurso del período académico mostraron un compromiso de enseñanza formidable y transmitieron esa pasión, motivación y entrega por esta nuestra profesión.

A mis tutores, Dr. Andrés Zornoza, Dr. Daniel Aguado y Paula Barbarroja, que estuvieron orientándome durante este año para lograr el objetivo del trabajo y de generar nuevos conocimientos en mi formación profesional.

Un agradecimiento al grupo de Química y Microbiología del Agua del IIAMA, por facilitar sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo. Especialmente a todas las personas que lo conforman, porque me acogieron de una forma muy grata y con quienes compartí buenos momentos, dejando recuerdos inmemorables. A la empresa de explotación Depuración de Aguas del Mediterráneo (DAM) por facilitar los datos de explotación y las muestras.

A mi familia, porque son el motor de mi vida y sin su apoyo incondicional no hubiese sido posible alcanzar este nuevo logro en mi vida. A mi padre que sin su ayuda no hubiese sido posible llevar a término estos estudios.

A Dios por tenerme hoy aquí trazando un camino que visione.

RESUMEN

La sociedad actual enfrenta una serie de problemas ambientales que se han intensificado a razón del crecimiento exponencial de la población. Dos de los principales problemas ambientales a nivel local son el deterioro marino y la contaminación del recurso hídrico, los cuales se suman al problema mundial de pérdida de biodiversidad. Para afrontar estas problemáticas ambientales, se han creado diferentes estrategias de control. Una de ellas son las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), cuyo principal objetivo es eliminar o reducir los contaminantes presentes en el agua, para su posterior vertido a los cuerpos de agua. Uno de los contaminantes más importantes en las aguas residuales y perjudiciales para la vida acuática, por sus características tóxicas y precursoras de la eutrofización, son los compuestos nitrogenados, los cuales son eliminados mediante un proceso biológico de nitrificación y desnitrificación. El primero de ellos, es realizado en dos etapas bajo condiciones aerobias por dos grupos de bacterias filogenéticamente diferentes, las bacterias amonioxidas, las cuales realizan la oxidación de amonio a nitrito, y las bacterias oxidantes del nitrito, responsables de la oxidación de nitrito a nitrato.

Ingenieros y científicos están inmersos en la búsqueda continua de conocer más a fondo los procesos biológicos que se desarrollan en los reactores de las EDAR, al igual que encontrar la mejor forma de explotación de estas para obtener el máximo beneficio al menor costo económico. El presente TFM se ha desarrollado dentro del proyecto de investigación: "Estudio de la influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica de la estructura de la población de bacterias nitrificantes", realizado por el Grupo de Química y Microbiología del Agua del IIAMA, para la EDAR Molina de Segura. Este proyecto se enmarca dentro de las estrategias de mejora del proceso biológico de la EDAR, las cuales tienen como objetivo aumentar la calidad del efluente y optimizar el coste energético del proceso. Dicha instalación está diseñada para tratar un caudal medio de 25.000 m³/d con un proceso biológico A/O.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad en las tasas de respiración de las bacterias nitrificantes en función de las variables operacionales, fisicoquímicas y biológicas (protistas y metazoos) de la EDAR Molina de Segura, que cuenta con un proceso de fangos activados. Para lograrlo se tomaron 22 muestras del licor mezcla, durante el período de noviembre de 2017 a junio de 2018. A cada una de estas muestras se le realizó la medición de las tasas de respiración endógena y exógena, siguiendo un protocolo establecido para tal fin, además de los valores de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las bacterias nitrificantes y heterótrofas. Posteriormente, se relacionó estadísticamente los valores de las variables ambientales con los resultados de las variables respirométricas. Dicho análisis se basó en la exploración del conjunto de variables empleando diferentes estrategias, entre ellas, el análisis bivalente (correlación de Pearson), análisis de conglomerados (clúster), técnicas multivariantes con un enfoque no paramétrico (nMDS) y, finalmente, un análisis de interpretación ambiental mediante la construcción de modelos lineales basados en la distancia (DISTLM).

Los resultados obtenidos han mostrado que el proceso de nitrificación de la EDAR es limitado, debido a las condiciones de operación desfavorables para el crecimiento de las bacterias

nitrificantes. Entre estas, destaca elevados sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla (SSVLM), los cuales duplican los valores habituales de otras depuradoras y, con ello, la baja carga de nitrógeno amoniacal (CN-NH_4^+). Además, el elevado tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario (TRHds) causa estrés ambiental, reducción en la tasa de crecimiento y lisis celular. Por otro lado, la deficiencia de nutrientes, debido a la precipitación del fósforo con cloruro férrico a la entrada del reactor, así como la baja carga de nitrógeno, limitan también dicho proceso. Finalmente, la carga orgánica (CM), favorece el crecimiento de bacterias heterótrofas sobre las nitrificantes.

La planta cuenta con un alto rendimiento de eliminación de nitrógeno, estable durante el período de estudio, tanto para el rNTs como para el rNKTs, debido probablemente a que el nitrógeno está siendo eliminado principalmente por asimilación para el crecimiento celular de bacterias heterótrofas, las cuales poseen mayor tasa de crecimiento y mayor adaptación a los cambios de las variables ambientales.

Palabras claves: respirometría, EDAR, nitrificación, fango activo, bioindicador.

RESUM

La societat actual enfronta una sèrie de problemes ambientals que s'han intensificat a raó de el creixement exponencial de la població. Dos dels principals problemes ambientals a nivell local són la deterioració marina i la contaminació del recurs hídic, els quals se sumen al problema mundial de pèrdua de biodiversitat. Per a afrontar aquestes problemàtiques ambientals, s'han creat diferents estratègies de control. Una d'elles són les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR), que el seu principal objectiu és eliminar o reduir els contaminants presents en l'aigua, per al seu posterior abocament als cossos d'aigua. Un dels contaminants més importants en les aigües residuals i perjudicials per a la vida aquàtica, per les seues característiques tòxiques i precursors de l'eutrofització, són els compostos nitrogenats, els quals són eliminats mitjançant un procés biològic de nitrificació i desnitrificació. El primer d'ells, és realitzat en dues etapes sota condicions aerobias per dos grups de bacteris filogenèticament diferents, els bacteris amoniooxidants, les quals realitzen l'oxidació d'amoni a nitrit, i els bacteris oxidants del nitrit, responsables de l'oxidació de nitrit a nitrat.

Enginyers i científics estan immersos en la cerca contínua de conèixer més a fons els processos biològics que es desenvolupen en els reactors de les EDAR, igual que trobar la millor forma d'explotació d'aquestes per a obtenir el màxim benefici al menor cost econòmic. El present TFM s'ha desenvolupat dins del projecte de recerca: "Estudi de la influència de les variables operacionals i fisicoquímiques en la dinàmica de l'estructura de la població de bacteris nitrificantes", realitzat pel Grup de Química i Microbiologia de l'Aigua de l'IllAMA, per a l'EDAR Molina de Segura. Aquest projecte s'emmarca dins de les estratègies de millora del procés biològic de l'EDAR, les quals tenen com a objectiu augmentar la qualitat de l'efluent i optimitzar el cost energètic del procés. Aquesta instal·lació està dissenyada per a tractar un cabal mitjà de 25.000 m³/d amb un procés biològic A/O.

L'objectiu d'aquest treball va ser estudiar la variabilitat en les taxes de respiració dels bacteris nitrificants en funció de les variables operacionals, fisicoquímiques i biològiques (protistas i metazoos) de l'EDAR Molina de Segura, que compta amb un procés de fangs. Per a aconseguir-ho es van prendre 22 mostres del licor barreja, durant el període de novembre de 2017 a juny de 2018. A cadascuna d'aquestes mostres se li va realitzar el mesurament de les taxes de respiració endògena i exògena, seguint un protocol establert per a tal fi, a més dels valors dels paràmetres cinètics i estequiòmètrics dels bacteris nitrificants i heteròtrofs. Posteriorment, es va relacionar estadísticament els valors de les variables ambientals amb els resultats de les variables respiromètriques. Aquesta anàlisi es va basar en l'exploració del conjunt de variables emprant diferents estratègies, entre elles, l'anàlisi bivariante (correlació de Pearson), anàlisi de conglomerats (clúster), tècniques multivariants amb un enfocament no paramètric (nMDS) i, finalment, una anàlisi d'interpretació ambiental mitjançant la construcció de models lineals basats en la distància (DISTLM).

Els resultats obtinguts han mostrat que el procés de nitrificació de l'EDAR és limitat, a causa de les condicions d'operació desfavorables per al creixement dels bacteris nitrificants. Entre aquestes, destaca elevats sòlids suspesos volàtils en el licor barreja (SSVLM), els quals dupliquen els valors habituals d'altres depuradores i, amb açò, la baixa càrrega de nitrogen amoniacal (CN-NH_4^+). A més, l'elevat temps de retenció hidràulic en el decantador secundari (TRHds) causa estrès ambiental, reducció en la taxa de creixement i lisis cel·lular. D'altra banda, la deficiència de nutrients, a causa de la precipitació del fòsfor amb clorur fèrric a l'entrada del reactor, així com la baixa càrrega de nitrogen, limiten també aquest procés. Finalment, la càrrega orgànica (CM), afavoreix el creixement de bacteris heteròtrofs sobre les nitrificants.

La planta compta amb un alt rendiment d'eliminació de nitrogen, estable durant el període d'estudi, tant per al rNTs com per al rNKTs, hagut de probablement al fet que el nitrogen està sent eliminat principalment per assimilació per al creixement cel·lular de bacteris heteròtrofs, les quals posseeixen major taxa de creixement i major adaptació als canvis de les variables ambientals.

Paraules claus: respirometria, EDAR, nitrificació, fang actiu, bioindicador.

ABSTRACT

Today's society faces a series of environmental problems that have become intensified due to the exponential growth of the population. Two of the main environmental problems at the local level are marine deterioration and pollution of the water resources, which are a global problem of biodiversity loss. To confront these environmental problems, different control strategies have been created. One of them is the sewage treatment plants (WWTP), which main objective is to eliminate or reduce the pollutants present in the water, for its later discharge to the water tanks. One of the most important pollutants in wastewater and harmful to aquatic life, due to its toxic characteristics and precursors of eutrophication, are the nitrogen compounds, which are eliminated through the biological process of nitrification and denitrification. The first of them, is carried out in two stages under aerobic conditions by two groups of phylogenetically different bacteria, the ammonium oxidizing bacteria, which carry

out the oxidation of ammonium to nitrite, and the oxidizing bacteria of nitrite, responsible for the oxidation of nitrite to nitrate.

Engineers and scientists are immersed in the constantly seeking to know more about the biological processes that take place in WWTP reactors, as well as to find the best way to exploit them to obtain the maximum benefit at the lowest economic cost. This master thesis has been developed within the research project: "Study of the influence of operational and physicochemical variables on the dynamics of the structure of nitrifying bacteria", which is carried out by the IIAMA Water Chemistry and Microbiology Group, for the Molina de Segura WWTP. This project is part of the strategies to improve the biological process of the WWTP, which aims to increase the quality of the effluent and optimize the cost of the process. This installation is designed to treat an average flow of 25,000 m³/d with a biological process A/O.

The objective of this work was to study the variability in the respiration rate of the nitrifying bacteria in function of the operational, physicochemical and biological variables (protists and metazoans) of the Molina del Segura WWTP which has an activated sludge process. To achieve this, 22 samples of the mixed liquor were taken during the period from November 2017 to June 2018. Each of these samples was measured the endogenous and exogenous respiration rates, following a protocol established for that purpose, besides the values of the kinetic and stoichiometric parameters of the nitrifying and heterotrophic bacteria. Subsequently, the values of the environmental variables were statistically related to the results of the respirometric variables. This analysis was based on the exploration of the variables using different strategies, among them, the bivariate analysis (Pearson correlation), cluster analysis (cluster), multivariate techniques with a non-metric multidimensional scaling (nMDS) and, finally, an analysis of environmental interpretation through the construction of linear models based on distance (DISTLM).

The results obtained have shown that the nitrification process of the WWTP is limited, due to the unfavorable operating conditions for the growth of the nitrifying bacteria. Among these, stand out the volatile suspended solids in the mixed liquor (SSVLM), which double the usual values of other purifiers and, with it, the low ammoniacal nitrogen load (CN-NH₄⁺). In addition, the high hydraulic retention time in the secondary decanter (TRHds) causes environmental stress, reduction in growth rate and cell lysis. On the other hand, the deficiency of nutrients, due to the precipitation of phosphorus with ferric chloride at the entrance of the reactor, as well as the low nitrogen load, also limit this process. Finally, the organic load (CM), favors the growth of heterotrophic bacteria on nitrifiers.

The plant has a high performance of nitrogen removal, stable during the study period, for both the rNTs and the rNKTs, probably because of the nitrogen is being eliminated by assimilation for the cell growth of heterotrophic bacteria, which they have a higher growth rate and greater adaptation to changes in environmental variables.

Keywords: respirometry, WWTP, nitrification, activated sludge, bioindicator.

ACRÓNIMOS

AOA	Arqueas oxidantes de amonio
ARI	Agua residual industrial
ARU	Agua residual urbana
ATP	Adenosín trifosfato
ATU	N-allylthiourea
BOA	Bacterias oxidantes del amonio
BON	Bacterias oxidantes del nitrito
CEC	<i>Council of the European Communities</i>
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
EPA	<i>Environmental protection agency</i>
ETAP	Estación de tratamiento de agua potable
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
LFS	Principio fase líquida con flujo de fase gaseosa y fase líquida estática
LSS	Principio de fase líquida con fase estática de gas y fase líquida estática
IWA	<i>International Water Association</i>
LM	Licor mezcla
VFO	Variables fisicoquímicas
VOP	Variables operacionales
VR	Variables respirométricas

NOMENCLATURA

Símbolo	Unidad	Descripción
μ_N	d^{-1}	Velocidad de crecimiento específico de bacterias nitrificantes
μ_{Nmax}	d^{-1}	Velocidad máxima de crecimiento específico de bacterias nitrificantes
AUR	$mgN-NH_4^+/lh$	Tasa de nitrificación
AUR'	$mgN-NH_4^+/lh$	Tasa de nitrificación a oxígeno máximo
AUR _{max}	$mgN-NH_4^+/lh$	Tasa de nitrificación máxima
b_H	d^{-1}	Coefficiente de desaparición de la biomasa heterótrofa
b_N	d^{-1}	Coefficiente de desaparición de la biomasa nitrificante
C_N	$mgN-NH_4^+/lh$	Capacidad de nitrificación del proceso
DBO	mg/l	Demanda biológica de oxígeno
DQO	mg/l	Demanda química de oxígeno
f_{cv}	$mgDQO/mgSSV$	Consumo de oxígeno por unidad de biomasa
F_{KN}	-	Factor de corrección por sustrato nitrificable
F_N	-	Fracción de biomasa nitrificante
f_{OD}	-	Factor de corrección por oxígeno disuelto

K_N	mgN-NH ₄ ⁺ /lh	Constante de semisaturación por sustrato
K_{OD}	mg/l	Coefficiente de semi-saturación de oxígeno
NKT	mg/l	Nitrógeno Kjeldahl Total
OC	mg/l	Oxígeno consumido
OD	mg/l	Oxígeno disuelto
OUR	mgO ₂ /lh	<i>Oxygen uptake rate</i> (velocidad de consumo de oxígeno)
OUR _{end}	mgO ₂ /lh	Velocidad de consumo de oxígeno en condiciones endógenas
OUR _{endH}	mgO ₂ /lh	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno de biomasa heterótrofa
OUR _{end,max}	mgO ₂ /lh	Tasa de consumo de O ₂ endógena máxima
OUR _{endN}	mgO ₂ /lh	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno de biomasa nitrificante
P	mg/l	Fósforo
Q _{afI}	m ³ /h	Caudal del afluente
Q _m	m ³ /h	Caudal medio
R _s	mgO ₂ /lh	Tasa de respiración dinámica o exógena
R _{sH}	mgO ₂ /lh	Tasa de respiración dinámica de biomasa heterótrofa
R _{sN}	mgO ₂ /lh	Tasa de respiración dinámica de biomasa nitrificante
R _{sp}	mgO ₂ /gh	Tasa de respiración específica
S _{NafI}	mgN-NH ₄ /l	Nitrógeno amoniacal medio de entrada al reactor biológico
S _{NH}	mgN-NH ₄ /l	Sustrato amoniacal
S _O	mg/l	Concentración de oxígeno disuelto
SOUR	mgO ₂ /gh	Tasa específica de consumo de oxígeno
SOUR _{endH}	mgO ₂ /gh	Tasa específica de consumo de oxígeno de heterótrofas
SOUR _{end,max}	mgO ₂ /gh	Tasa específica de consumo de oxígeno máxima
SOUR _{endN}	mgO ₂ /gh	Tasa específica de consumo de oxígeno de nitrificantes
S _s	mgDQO/l	DQO rápidamente biodegradable
SS	mg/l	Sólidos suspendidos
SSV	mg/l	Sólidos suspendidos volátiles
SSVLM	mg/l	Sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla
T _N	h	Tiempo de nitrificación mínimo requerido
T ^o	°C	Temperatura
TRC	h	Tiempo de retención celular
TRC _N	d	Tiempo de retención celular mínimo para nitrificación
TRH _{ds}	h	Tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario
TRH _r	h	Tiempo de retención hidráulico en el reactor
TRH _N	h	Tiempo de retención hidráulico disponible para la nitrificación
V _N	m ³	Volumen del reactor aerobio
V _r	m ³	Volumen del reactor

X_H	mg/l	Microorganismos heterótrofos
X_I	mg/l	Biomasa inerte
X_N	mg/l	Biomasa nitrificante
X_{NH}	mg/l	Concentración de Nitrógeno particulado
X_S	mg/l	DQO lentamente biodegradable
X_{SST}	mg/l	Concentración de Sólidos suspendidos
Y_H	mgO ₂ /mgO ₂	Coeficiente de producción de biomasa heterótrofa
Y_N	mgO ₂ /mgN-NH ₄	Coeficiente de producción de biomasa nitrificantes
$Y_{N,SSV}$	mgSSV/mgN-NH ₄	Coeficiente de producción de biomasa nitrificantes expresada en sólidos

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDO

pág.

1	INTRODUCCIÓN.....	2
1.1	Agua y medio ambiente.....	2
1.2	Generalidades de la depuración de aguas residuales.....	3
1.3	Variables operacionales y de control en estaciones depuradoras de aguas residuales.....	4
1.3.1	Carga orgánica.....	5
1.3.2	Concentración de la biomasa.....	5
1.3.3	Carga másica.....	5
1.3.4	Tiempo de retención celular.....	5
1.3.5	Oxígeno disuelto.....	5
1.4	Microorganismos que intervienen en la depuración de aguas residuales.....	6
1.4.1	Bacterias.....	6
1.4.2	Protozoos.....	9
1.4.3	Metazoos.....	9
1.4.4	Bioindicadores del rendimiento del proceso de fangos activados.....	9
1.5	El nitrógeno en las aguas residuales.....	11
1.5.1	Impactos ambientales asociados al nitrógeno.....	12
1.5.2	Eliminación biológica del Nitrógeno.....	13
1.5.3	Variables que afectan al proceso de nitrificación.....	15
1.6	La respirometría, técnica para el seguimiento y evaluación del proceso de nitrificación....	18
1.6.1	Utilidad de la respirometría en la depuración de las aguas residuales.....	19
1.6.2	Respirómetro.....	21
1.6.3	Tipo de ensayos respirométricos.....	22
2	OBJETIVOS.....	25
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1	Toma de muestras.....	27
3.2	Variables operacionales y fisicoquímicas del agua residual.....	27
3.3	Ensayos respirométricos.....	28
3.3.1	Preparación de la muestra del licor mezcla.....	28
3.3.2	Instalaciones y equipos.....	28
3.3.3	Protocolo de ensayos respirométricos.....	30
3.3.4	Métodos analíticos.....	31
3.3.5	Variables respirométricas.....	31

3.3.6	Parámetros cinéticos y estequiométricos.....	33
3.4	Variables biológicas.....	35
3.5	Análisis estadísticos.....	36
3.5.1	Prueba de valores atípicos (outliers).....	37
3.5.2	Análisis clúster.....	38
3.5.3	Coefficiente de correlación de Pearson.....	39
3.5.4	Análisis de componentes principales.....	39
3.5.5	Escalonamiento multidimensional no métrico.....	40
3.5.6	Análisis de similitudes.....	41
3.5.7	Análisis de redundancia basado en la distancia.....	41
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Relación entre las variables fisicoquímicas sobre el proceso de nitrificación.....	45
4.2	Relación entre las variables operacionales sobre el proceso de nitrificación.....	51
4.3	Variables bioindicadoras del proceso de nitrificación.....	53
4.4	Respuesta del proceso de nitrificación obtenida por respirometría.....	56
4.5	Modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia.....	61
4.5.1	Modelo de interpretación ambiental a partir de las variables de bioindicadores.....	61
4.5.2	Modelo de interpretación ambiental a partir de las variables de nitrógeno del efluente.....	62
4.5.3	Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables ambientales.....	63
4.6	Modelo de predicción del rendimiento de nitrógeno total Kjeldahl soluble.....	65
5	DISCUSIÓN.....	70
5.1	Influencia de las variables fisicoquímicas y operacionales sobre el proceso de nitrificación.....	70
5.2	Bioindicadores del proceso de eliminación del nitrógeno.....	72
5.3	Respuesta del proceso de nitrificación obtenidas por respirometría.....	74
5.4	Modelo lineal de variables ambientales y variables respirométricas.....	76
5.5	Modelo de interpretación ambiental a partir de las variables de bioindicadores.....	78
5.6	Modelo de interpretación ambiental a partir de las variables de nitrógeno del efluente.....	79
6	CONCLUSIONES.....	81
7	BIBLIOGRAFÍA.....	84
8	ANEXOS.....	99

ÍNDICE DE TABLAS

pág.

Tabla 1.1 Sistemas de tratamiento para la depuración de aguas residuales.....	3
Tabla 1.2 Compuestos nitrogenados y estados de oxidación.....	12
Tabla 1.3 Ensayos y medidas del equipo respirométrico.....	23
Tabla 3.1 Caracterización del agua residual, configuración y variables operacionales en el reactor.	28
Tabla 3.2 Métodos analíticos de espectrofotometría.....	31
Tabla 3.3 Número de muestras y fechas procedentes.....	36
Tabla 3.4 Porcentaje de variación explicado por ejes individuales del modelo DISTLM.....	43
Tabla 3.5 Interpretación de los resultados del DISTLM.....	43
Tabla 4.1 Resumen estadístico de las variables fisicoquímicas del licor mezcla y afluente al reactor	45
Tabla 4.2 Comparación de parámetros fisicoquímicos afluente al reactor y valores típicos de agua residual doméstica.....	46
Tabla 4.3 Resumen estadístico de las variables fisicoquímicas efluente y rendimientos.....	46
Tabla 4.4 Comparación de la calidad del efluente para nitrógeno con otras plantas.....	46
Tabla 4.5 Resumen estadístico de las variables operacionales más influyentes.....	51
Tabla 4.6 Comparación entre variables operacionales.....	52
Tabla 4.7 Estadísticos descriptivos de las variables bioindicadoras.....	53
Tabla 4.8 Valores comparativos de bioindicadores en estudios previos.....	54
Tabla 4.9 Estadísticos descriptivos de las variables respirométricas.....	57
Tabla 4.10 Parámetros estequiométricos y cinéticos a partir de resultados respirométricos.....	60
Tabla 4.11 Comparación de valores bibliográficos de respirometría y cinéticos.....	61
Tabla 4.12 Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables respirométricas y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA.....	62
Tabla 4.13 Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables respirométricas y correlaciones de Pearson de componentes del nitrógeno con los ejes del dbRDA.....	63

Tabla 4.14 Coeficientes de correlación múltiple parcial de las operacionales y correlaciones de Pearson de las variables respirométricas con los ejes del dbRDA.....	64
Tabla 4.15 Resumen del modelo de predicción de rNKTs.....	66
Tabla 4.16 Coeficientes del modelo de predicción.....	66
Tabla 8.1 Matriz de variables operacionales.....	99
Tabla 8.2 Matriz de variables fisicoquímicas y nutrientes del afluente al reactor.....	100
Tabla 8.3 Matriz variables de nitrógeno efluente y rendimientos.....	101
Tabla 8.4 Matriz de bioindicadores.....	102
Tabla 8.5 Matriz de variables respirométricas.....	103
Tabla 8.6 Parámetros cinéticos, estequiométricos y variables de control.....	104
Tabla 8.7 Análisis bivalente de correlación de Pearson entre variables operacionales y fisicoquímicas del afluente y efluente.....	105
Tabla 8.8 Análisis bivalente de correlación de Pearson entre variables operacionales y respirométricas.....	106
Tabla 8.9 Variables ambientales complementarias.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

pág.

Figura 1.1 Modelo de lisis regeneración.....	7
Figura 1.2 Esquema del proceso de nitrificación y desnitrificación.....	14
Figura 1.3 TRC mínimo para BOA y BON en función de la temperatura.....	16
Figura 1.4 Clasificación de un respirómetro de acuerdo a la IWA.....	22
Figura 1.5 Relación entre respiración, oxidación del sustrato y crecimiento.....	22
Figura 3.1 Esquema de EDAR Molina de Segura.....	27
Figura 3.2 Representación esquemática del respirómetro BM-Advance Pro.....	29
Figura 3.3 Respirograma de la tasa máxima de respiración de bacterias nitrificantes mediante un ensayo R.....	29
Figura 3.4 Protocolo de trabajo de los ensayos respirométricos.....	30
Figura 3.5 Control de placa para calibración de temperatura y pH.....	31
Figura 3.6 Respirograma de tasa de consumo endógeno máximo, OUR y SOUR global.....	32
Figura 3.7 Tasa de respiración endógena global, de bacterias heterótrofas y nitrificantes.....	32
Figura 3.8 Procedimiento para el recuento de protistas y metazoos en el microscopio.....	35
Figura 3.9 Tipos de correlación.....	39
Figura 3.10 Interpretación de un gráfico nMDS.....	41
Figura 4.1 Evolución del nitrógeno inorgánico en el efluente.....	47
Figura 4.2 Diagrama de barras del rendimiento de eliminación del nitrógeno.....	47
Figura 4.3 Diagrama de cajas y bigotes de nitrógeno y rendimientos.....	48
Figura 4.4 Diagrama clúster mensual de nitrógeno del efluente.....	48
Figura 4.5 Gráfico de burbujas a partir de los componentes del nitrógeno.....	49
Figura 4.6 Variación de nutrientes y cargas en el afluente al reactor.....	50
Figura 4.7 Carga de nitrógeno disponible vs requerida por asimilación de la biomasa.....	51

Figura 4.8 Variables operacionales.....	52
Figura 4.9 Diagrama de la frecuencia de aparición y abundancia de las especies de protistas.....	54
Figura 4.10 Clúster mensual de muestras y mapa de calor de bioindicadores.....	55
Figura 4.11 Análisis de componentes principales (ACP) de bioindicadores con rendimiento de eliminación de nitrógeno.....	56
Figura 4.12 Respirogramas de la muestra ML8.....	56
Figura 4.13 Tasas de respiración de la biomasa.....	57
Figura 4.14 Gráfica de dispersión de la tasa de respiración específica vs tasa de nitrificación.....	58
Figura 4.15 Clúster de variables respirométricas.....	58
Figura 4.16 Relación de la carga másica (CM) vs. tasa de nitrificación (AUR).....	59
Figura 4.17 Gráfico de burbujas de la SOUR _{end} .max ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y la densidad de bioindicadores.....	62
Figura 4.18 Gráfico de burbujas de la μ N _{max} ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y nitrógeno del efluente.....	63
Figura 4.19 Gráfico de burbujas del TRC ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y operacionales.....	64
Figura 4.20 Gráfico de burbujas del T ^º ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y operacionales.....	65
Figura 4.21 Gráfico de burbujas del N-NH ₄ ⁺ ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables nitrógeno efluente y operacionales.....	65
Figura 4.22 Gráfica de dispersión de valores predichos vs. valores medidos de rNKTs.....	67
Figura 4.23 Gráficas de residuos de rNKTs.....	67
Figura 8.1 Diagrama de flujo EDAR Molina de Segura.....	108

I.INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Agua y medio ambiente

Los asentamientos humanos, a lo largo de la historia, se han visto influenciados por la presencia de recursos en su entorno, por alimentos y cobijo, principalmente. Dicha situación, ha ocasionado que las civilizaciones se hayan asentado en las cercanías de los cuerpos de agua como ríos, lagos, estuarios y mares, los cuales brindan bienes y servicios con los que satisfacer las diferentes necesidades del hombre a través de este preciado recurso.

El consumo y uso de los recursos hídricos genera cambios en su calidad y cantidad una vez son devueltos al ambiente. El actual incremento de la población en los núcleos urbanos, el desarrollo industrial y el auge del sector agrícola, ha aumentado la cantidad de vertidos al medio natural hasta límites que superan su capacidad de autodepuración. Aunque los recursos hídricos sean percibidos como recursos renovables, se deben tomar medidas para asegurar que lo sigan siendo, de lo contrario, se tendría consecuencias importantes en ámbitos ambientales, económicos y de salud pública.

Por lo anterior, resulta trascendental contemplar conocimientos, capacidad financiera e infraestructura para garantizar condiciones óptimas en el agua, para sus diversos usos o para el posterior vertido al medio ambiente. Una de las medidas para conseguirlo ha sido la construcción de estaciones de tratamiento de agua potable (ETAP) y las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), que surgieron en el siglo XIX. Estas se iniciaron tras la revolución industrial, momento en que se da una transformación en el ámbito tecnológico, permitiendo implementar este tipo de herramientas para reducir el deterioro de los recursos hídricos y mejorar la calidad del agua.

En relación a la situación actual que afronta la sociedad (desabastecimiento, transmisión de enfermedades por microorganismos patógenos, pérdida de biodiversidad, agotamiento del recurso, etc.); la prevención de la contaminación y la rehabilitación de fuentes de agua ya contaminadas deben ser acciones prioritarias con respecto al desarrollo de tecnologías de depuración. Estas tecnologías de depuración son cada vez más complejas y su costo aumenta a medida que el número de contaminantes crece. Por esta razón, las soluciones "*End of Pipe*" para los efluentes de agua residual urbana (ARU) y agua residual industrial (ARI) deben ser sustituidas por prácticas de racionalización, reciclado y reusó (Prando, 1996).

Por lo tanto, se vuelve necesario contemplar el concepto de I+D+i (investigación, desarrollo e innovación) para encontrar estrategias de control en los procesos de depuración, tanto biológicos como fisicoquímicos, que permitan lograr los objetivos a un menor coste. Esto supone, por ejemplo, reducir el consumo energético del proceso de depuración, el cual representa un 3% del consumo de energía en países desarrollados como en los Estados Unidos (McCarty *et al.*, 2011). De este modo, el avance en conocimiento y tecnología en la depuración de aguas, permiten enmarcarse dentro del desarrollo sostenible, logrando una explotación eficiente y amigable con el medio ambiente.

1.2 Generalidades de la depuración de aguas residuales

El propósito de los tratamientos de aguas residuales es eliminar los contaminantes que pueden llegar al medio acuático y de esta forma evitar o reducir los impactos ambientales generados, por la toxicidad de los contaminantes y por el descenso en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, que resultan perjudiciales para la vida acuática. Los compuestos orgánicos son quienes ejercen una mayor demanda de oxígeno para su degradación; aun así, el nitrógeno amoniacal, siendo un compuesto inorgánico, es de los contaminantes más importantes que influyen en el deterioro del recurso hídrico, dando origen al ya conocido problema de eutrofización (Grady *et al.*, 2011).

Conseguir una calidad en el agua acorde a criterios normativos y sustentables, requiere de una serie de tratamientos mediante operaciones y procesos físicos, químicos y biológicos con los cuales se logren eliminar los contaminantes presentes en el agua y, de este modo, verterla posteriormente al medio sin que se generen impactos significativos en el entorno o para su posterior reutilización. Las etapas de tratamiento más frecuentes que suelen encontrarse en una EDAR son: el pretratamiento, tratamiento primario y secundario, el tratamiento de los fangos producidos y ocasionalmente el tratamiento terciario. Este último, consiste en la aplicación de tratamientos físicos, químicos y/o biológicos, a fin de obtener una mejor calidad del agua tratada para cumplir los valores máximos permitidos de vertido. En la tabla 1.1 se resumen las etapas y todos aquellos procesos u operaciones que se llevan a cabo dentro de cada una de estas, al igual que el propósito perseguido para el tratamiento de las aguas residuales.

Tabla 1.1 Sistemas de tratamiento para la depuración de aguas residuales. Adaptado de: (Rittmann & McCarty, 2001)

Etapas	Método de tratamiento	Objetivo
Pretratamiento	Enrejados Tamices Homogenización Mezclado Desengrasado- Desarenado	Eliminar elementos que pueden perjudicar a las instalaciones posteriores al tratamiento; evitando obstrucciones en los equipos de bombeo y tuberías, así como evitar la acumulación de sólidos inertes en la línea de fangos. Eliminar grasas y aceites que pueden generar desequilibrios biológicos, además de arenas que pueden generar desgaste a equipos mecánicos.
Tratamiento Primario	Coagulación/Floculación Precipitación química Oxidación-Reducción Sedimentación	Elimina sólidos suspendidos (SS) junto con sus contaminantes asociados y lo que pueda perjudicar al tratamiento biológico.
Tratamiento Secundario	Aireación Tratamiento biológico Sedimentación Precipitación	Potenciar una serie de reacciones de oxidación-reducción a través de una comunidad heterogénea de bacterias presentes en el fango activo, utilizando los contaminantes como fuente de energía y nutrientes para su crecimiento y biosíntesis.

Tabla 1.1(Continuación) Sistemas de tratamiento para la depuración de aguas. Adaptado de: (Rittmann & McCarty, 2001)

Etapa	Método de tratamiento	Objetivo
Tratamiento Terciario	Filtración	Eliminar patógenos y contaminantes no eliminados en las fases anteriores.
	Extracción gas-líquido	
	Proceso de membrana	
	Adsorción	
	Oxidación	
	Cambio iónico	
	Desinfección	
Tratamiento de Fangos	Sedimentación	Concentración de los lodos, reducción de material putrescible y reducción del volumen.
	Flotación	
	Digestión biológica	
	Estabilización química	
	Deshidratación	

El proceso de fangos activados es una de las tecnologías más extendida para la depuración de las aguas residuales. Este proceso se basa en la aireación de las aguas residuales para el tratamiento biológico, seguido de la separación del agua residual tratada y recirculación de una parte del fango que se devuelve al sistema. Habitualmente, la separación del fango del agua residual tratada se realiza mediante sedimentación (separación por gravedad) pero también puede realizarse mediante flotación y otros métodos (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Además, puede ser aplicado a diferentes tipologías de reactores, entre ellos, proceso de mezcla completa, proceso de flujo en pistón, oxidación total, canales de oxidación, oxidación por contacto-estabilización, sistema de adsorción-estabilización (A+B) y reactores de membranas (el lector podrá encontrar más detalle de cada proceso en Ferrer & Seco (2007)).

El proceso de fangos activados ha sido desarrollado principalmente para la eliminación de la materia orgánica y nutrientes (nitrógeno y fósforo), alternando etapas aerobias, anóxicas y anaerobias. Los microorganismos, principalmente bacterias, convierten la materia orgánica y los nutrientes en compuestos más simples, así como en nueva biomasa (Wang *et al.*, 2009). En resumen, los microorganismos utilizan el sustrato del agua residual para crecer y producir energía, provocando de esa forma el descenso en la concentración de contaminantes presentes en el agua residual.

1.3 Variables operacionales y de control en estaciones depuradoras de aguas residuales

En una EDAR con proceso de fangos activados existe una serie de variables fisicoquímicas (VFO) y operacionales (VOP) que se deben medir y controlar para garantizar un tratamiento óptimo en la planta. Los parámetros fisicoquímicos y operacionales básicos de control y diseño más utilizados en la explotación diaria de las plantas son: la carga orgánica, la concentración de la biomasa, los sólidos suspendidos totales (SST), el nitrógeno total (NT), el fósforo total (PT), la carga másica (CM), el tiempo de retención celular (TRC) y el oxígeno disuelto (OD) (Tchobanoglous & Burton, 1995).

1.3.1 Carga orgánica

Es la cantidad diaria de materia orgánica que entra al reactor y se calcula a partir de la concentración de DBO₅ o DQO y del caudal diario, expresándose en kgO₂/d. Es claro que existe una relación estrecha tanto de la DBO₅ como la DQO con la microfauna, dado que ambas son una forma de medir el alimento que entra a la planta. Sin embargo, las correlaciones entre estas variables y los microorganismos varían en función del tipo de agua residual que se trata y de la especie en cuestión. Salvadó & García (1993) mencionan un efecto de la velocidad de crecimiento de microorganismos por variaciones de DBO₅ del afluente. Es importante medir esta variable para prever las condiciones de operación, como el requerimiento de oxígeno y el objetivo de remoción.

1.3.2 Concentración de la biomasa

La concentración de la biomasa se mide en sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla, (SSVLM) y representa la materia en suspensión de tipo orgánico, expresado en kg/m³. Su medición es importante puesto que son los microorganismos los encargados de la oxidación de la materia orgánica y nutrientes, por lo que se debe de asegurar una concentración de biomasa en el reactor que garantice la remoción de los contaminantes. Además, este parámetro influye en el cálculo de la carga másica y tiempo de retención celular comentados a continuación.

1.3.3 Carga másica

La carga másica (CM) es el parámetro que trata de representar la relación existente entre la carga orgánica y la concentración de biomasa presente en el reactor biológico, expresada como kgDBO₅/kgSSVLM.d. Es de vital importancia conocer y controlar esta variable puesto que representa una aproximación de la relación entre alimento y microorganismos presentes, reflejando si habrá crecimiento de la biomasa y la eliminación de los contaminantes.

1.3.4 Tiempo de retención celular

El TRC (también denominado como edad del fango, EF) es la relación entre la masa de microorganismos presentes en el reactor y la masa de microorganismos purgados del sistema diariamente, expresado en días. Este parámetro aproxima el tiempo medio que permanece una célula en el proceso, ya que estos siguen un ciclo desde que son decantados y recirculados al reactor, hasta que salen por la corriente de purga de fangos en exceso.

El TRC interviene en la composición bacteriana y, por lo tanto, de la microfauna que de ella se alimenta. Los microorganismos presentan diferentes tasas de crecimiento, algunos más bajas que otros, es decir, que sólo aquellos protozoos y bacterias con tasas de crecimiento superiores a los tiempos de retención podrán sobrevivir (Ferrer *et al.*, 2007). Esto supone operar con un TRC que permita el crecimiento de la biomasa deseada para el tratamiento del agua residual.

1.3.5 Oxígeno disuelto

Este parámetro es quizás uno de los más influyentes en la eliminación de la materia orgánica y nutrientes, debido a las necesidades de oxígeno que requieren los microorganismos para su metabolismo. Conocer las necesidades de oxígeno en el reactor biológico permite operar con los niveles de oxígeno necesarios y garantizar un tratamiento eficiente; sin estar por debajo

de las necesidades, ocasionando una depuración insuficiente o generando un gasto energético innecesario.

1.4 Microorganismos que intervienen en la depuración de aguas residuales

La presencia de las comunidades microbianas enmarca la depuración biológica de las aguas residuales, en donde sus características intrínsecas desempeñan un papel diferente en el proceso de depuración. No existe un único organismo capaz de utilizar todos los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en las aguas residuales, por lo que un proceso biológico constituye un ecosistema diverso de microorganismos y su presencia-ausencia está condicionada por variables del diseño y condiciones de operación de la planta, al igual que las características fisicoquímicas del agua residual afluyente y licor mezcla (Ciaccio, 1971).

Los organismos presentes en un proceso biológico de fangos activados pueden ser clasificados en diversas formas. A nivel de la depuración de aguas, la clasificación trófica es de gran importancia (Ferrer & Seco, 2007). Estos se encuentran constituidos por bacterias, arqueobacterias, cianobacterias, protistas, metazoos, hongos y algas (Seviour & Nielsen, 2010). Las bacterias y los protistas son considerados como los principales responsables de la eficiencia en el tratamiento biológico del agua residual. Cada una de estas poblaciones desempeña un papel determinado en el proceso y, en conjunto, forman la comunidad biótica característica de los fangos activados.

1.4.1 Bacterias

Los organismos más directamente relacionados con el tratamiento del agua residual son las bacterias, las cuales dominan sobre otros grupos en número y biomasa, e intervienen en el proceso de mineralización y eliminación de la materia orgánica y nutrientes (Rius, 2003). Además, constituyen la mayor fracción de la biomasa del fango activo (90-95% de la biomasa existente) siendo, por lo tanto, el grupo dominante dentro de la microfauna de los fangos activados (Ferrer & Seco, 2007). Su pequeño tamaño y su elevada relación superficie/volumen favorecen el intercambio de nutrientes y catabolitos con el medio que los rodea (Fernández *et al.*, 1996).

Los organismos unicelulares requieren: carbono, nutrientes inorgánicos, energía y poder reductor para su crecimiento. Consumen la materia orgánica biodegradable (como proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos) presente en las aguas residuales y obtienen la energía y el poder reductor de las reacciones de oxidación. Esto implica la cesión de electrones por el sustrato y su transferencia hasta el aceptor final de electrones. La suma de todas las transformaciones bioquímicas que se suceden en las células se conoce como metabolismo. El objetivo principal de estas transformaciones en los microorganismos es la síntesis celular (Manga, 2000).

La vía reproductiva más común de las bacterias es por fisión binaria, donde la célula original se convierte en dos organismos nuevos. El tiempo requerido para cada división, conocido como tiempo de generación o de duplicación, puede variar desde menos de 20 minutos hasta varios días. Existen limitaciones ambientales que frenan la duplicación, como la disponibilidad del sustrato, concentración de nutrientes, o incluso el tamaño del sistema (Moeller, 2010).

Los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales se basan en la interacción y el metabolismo de los microorganismos. Los procesos por los cuales se ven envueltos estos microorganismos para llevar a cabo su metabolismo son esenciales para un correcto funcionamiento de la depuración de las aguas, siendo, por lo tanto, el componente biológico más sensible en una EDAR. Estos procesos han sido estudiados por diferentes autores, entre ellos Wentzel *et al.* (1992); Henze *et al.* (1995); Gujer *et al.* (1999), para conocer en detalle el proceso de tratamiento biológico y generar, además, modelos de simulación que puedan asemejarse a la realidad y logren evaluar de forma detallada lo que acontece en el ecosistema que rodea al grupo de bacterias presentes en los fangos activados. En la figura 1.1. se muestran los procesos de organismos heterótrofos y autótrofos y las transformaciones que tienen lugar en el medio. Las más representativas son el crecimiento celular, la desaparición de la biomasa y la hidrólisis (proceso llevado a cabo únicamente por bacterias heterótrofas). En dicha figura se representa la base del funcionamiento de la técnica respirométrica, de la que se hablará más adelante y que se busca medir el consumo de oxígeno durante el proceso de oxidación y crecimiento de las bacterias.

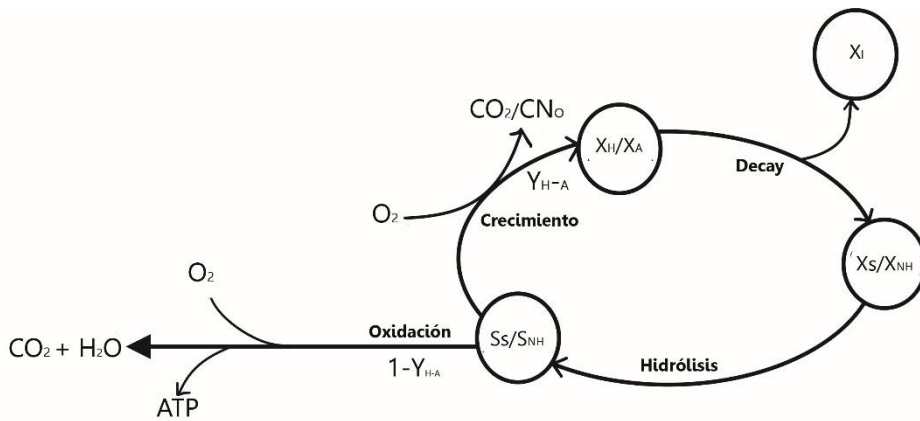


Figura 1.1 Modelo de lisis regeneración. Fuente: (Vanrolleghem, 2002)

Aunque las bacterias pueden ser clasificadas con base en diferentes criterios (donador de electrones, fuente de carbono, aceptor terminal de electrones, etc.), algunos autores las agrupan según su función e importancia dentro de la estructura de la comunidad del fango activo (Seviour & Nielsen, 2010). De esta forma, las bacterias dentro de la comunidad quedarían agrupadas de la siguiente forma: quimioorganoheterótrofas, desnitrificantes, degradadoras de polímeros, bacterias del hierro, bacterias reductoras de sulfato, bacterias acumuladoras de polifosfatos (PAOs, *polyphosphate accumulating organisms*), bacterias acumuladoras de glucógeno (GAOs, *glycogen accumulating organisms*), bacterias acumuladoras de poli- β -hidroxialcanoatos (PHA) y bacterias quimiolitotróficas (bacterias nitrificantes y bacterias oxidantes de sulfuros).

Bacterias responsables del proceso de nitrificación

Las bacterias nitrificantes son autótrofas, quimiolitótrofas y estrictamente aerobias. En primer lugar, son estrictamente aerobias por necesitar oxígeno como aceptor de electrones para su proceso metabólico. Se definen como autótrofas porque pueden fijar y reducir carbono inorgánico como fuente de carbono para la síntesis de material celular, convirtiéndolo en un proceso energéticamente caro y como consecuencia en el principal responsable de poseer una baja transferencia de electrones y coeficiente de rendimiento. Su naturaleza

quimiolitótrofa hace que estos valores sean aún más bajos, porque su donador de electrones libera menos energía por electrón que un donador de electrones orgánico, H₂, o formas reducidas del azufre. Un bajo rendimiento (Y) se traduce en una pequeña tasa de crecimiento y altos tiempos de retención celular (Rittmann & McCarty, 2001). Por cada molécula de dióxido de carbono asimilado, se oxidan aproximadamente 30 moléculas del ion amonio o 100 moléculas de nitrito. Debido a la gran cantidad de iones amonio y nitrito necesarios para asimilar dióxido de carbono, las bacterias nitrificantes tienen una velocidad de crecimiento lento (Gerardi, 2002), además de caracterizarse por poseer sistemas membranosos internos complejos.

Las bacterias nitrificantes están ampliamente distribuidas en el planeta, encontrándose en diferentes hábitats, incluyendo agua dulce, agua de mar, agua salobre y en el suelo, soliendo encontrarse en abundancia en medios con elevados niveles de amonio y pH alcalino.

Recientemente se ha descubierto que algunos organismos del dominio archaea son capaces de llevar a cabo el proceso de oxidación del amonio (AOA, archaeas oxidantes de amonio) en océanos y suelos bajo ciertas condiciones ambientales extremas, asociadas principalmente a ecosistemas que presentan elevada salinidad y temperatura, y muy baja disponibilidad de nutrientes (Seviour & Nielsen, 2010a). Por tanto, la oxidación secuencial aeróbica del amonio a nitrito y luego a nitrato pueden ser catalizados por organismos procariontes quimiolitótrofos: BOA, AOA y BON.

Bacterias oxidantes del amonio (BOA): Todos los géneros de BOA conocidos pertenecen al phylum *Proteobacteria*, en el cual se distinguen dos clases: las Betaproteobacterias, quienes predominan en los procesos de tratamiento de aguas residuales, y las Gammaproteobacterias, las cuales son halófilas y no tienen presencia significativa en los procesos biológicos de las EDAR.

Arqueas oxidantes de amonio (AOA): Algunos estudios indican la capacidad de organismos pertenecientes al dominio Archaea de llevar a cabo la oxidación del amonio en suelos y océanos (Schleper *et al.*, 2005; Graeme & Schleper, 2006). Posteriormente, los estudios de Beman *et al.* (2008) han confirmado que estos organismos juegan un papel importante en la nitrificación en ecosistemas marinos y terrestres.

AOA del phylum *Crenarcheota* y *Thaumarchaeota* (Spang *et al.*, 2010) han sido detectadas en EDAR (Wells *et al.*, 2009) y en EDARI (Marc Mußmann, 2011). Pese a los hallazgos encontrados no se ha definido si estos microorganismos crecen exclusivamente por medio de la oxidación del amonio.

Bacterias oxidantes del nitrito (BON): Las BON se caracterizan por ser un grupo más diverso que las BOA. Los géneros descritos, a excepción de *Nitrospira*, *Nitrospina* y *Nitrolanceetus*, se encuentran dentro del phylum *Proteobacteria*. *Nitrobacter*, perteneciente a las alphaproteobacterias, ha sido considerado como predominante en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Henze, 1997). Sin embargo, en estudios posteriores en plantas a escala real basados en técnicas moleculares de hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con fluoróforos (FISH, *fluorescence in situ hybridization*), confirmaron que *Nitrospira* era la especie clave en este proceso (Juretschko *et al.*, 2002); a

excepción de reactores que tratan elevadas concentraciones de nitrito, en los que *Nitrobacter* puede alcanzar una abundancia relativamente alta (Daims *et al.*, 2001). Esto es debido a que *Nitrobacter* presenta mejor adaptación a altas concentraciones de NO_2^- , mientras que *Nitrospira* se adapta mejor a las bajas concentraciones (Schramm, 1999). Dentro del phylum *proteobacteria*, asociadas a ambientes marinos, se encuentran los géneros *Nitrococcus* (*Nc. mobilis*) en la clase *Gammaproteobacteria* y *Nitrotoga* (*N. artica*) en la clase *Betaproteobacteria* (Alawi, 2007).

1.4.2 Protozoos

Los protozoos son organismos unicelulares eucariotas, no tan abundantes como las bacterias, que constituyen aproximadamente el 9% de la biomasa de los fangos activados (Madoni, 1994). Poseen diferentes vías metabólicas, y se pueden alimentar de materia orgánica disuelta (osmótrofos) y predación de microorganismos (holozoicos), siendo esta última el papel más importante en el tratamiento biológico al clarificar el efluente. Además, segregan enzimas que estimulan la floculación de las bacterias. Se pueden encontrar en los fangos activados tres grandes grupos según su morfología y movilidad: flagelados, ciliados y sarcodinos (Mara & Horan, 2003).

1.4.3 Metazoos

Los metazoos son organismos pluricelulares holozoicos (se alimentan de bacterias dispersas y floculantes), favoreciendo a la clarificación del agua. En sistemas de fangos activados se han reportado los siguientes grupos: rotíferos, nemátodos, anélidos y gastrótricos (Vasco *et al.*, 2009). Se les considera indicadores de un buen funcionamiento del proceso de depuración, siempre y cuando no alcancen densidades excesivas (Zornoza, 2017). Su presencia en los reactores indica una elevada edad del fango (Madoni, 1991).

1.4.4 Bioindicadores del rendimiento del proceso de fangos activados

Años más tarde de los comienzos del tratamiento de las aguas residuales mediante fangos activados, la función de los microorganismos (bacterias y protistas) fue el principal objetivo de numerosos estudios sobre el papel trascendental de estos en la depuración. Además, los efectos negativos que pueden presentarse por la presencia y abundancia de ciertos microorganismos fueron estudiados por algunos autores (Pirt & Bazin, 1972).

La bioindicación es una técnica por la cual, mediante la observación microscópica de un fango activo, se puede conocer el funcionamiento del proceso y cómo variar los parámetros operacionales con el objetivo de conseguir un óptimo rendimiento en la depuración. Los protistas y metazoos han sido los principales microorganismos potenciales indicadores de la eficiencia y rendimiento del proceso, ya que toleran condiciones ambientales puntuales y manifiestan su presencia según las características del medio. Conocer estas características de hábitat permite prever situaciones que en pocos casos pueden ser detectables mediante técnicas analíticas convencionales, logrando actuar en las variables operacionales antes de que se presenten problemas graves en el proceso (Vasco *et al.*, 2009).

Las especies de protistas presentes en fangos activados como bioindicadores han sido estudiadas desde principios de la depuración de aguas hasta la actualidad (Curds & Cockburn, 1970; Madoni, 1991; Salvadó, 1995; Vasco *et al.*, 2009; Zornoza, 2017), siendo los parámetros operacionales los principales, pero no únicos, enfoques de investigación. De

este modo, se han podido describir las relaciones entre microorganismos y las variables de control del proceso y desarrollar métodos para la monitorización biológica del proceso de tratamiento del agua residual por fangos activados. El alcance de las relaciones de bioindicación con las variables cruzadas, se basa de un correcto recuento en la abundancia y diversidad de taxones.

Tres aspectos importantes que condicionaban la presencia de protistas fueron descritos en el trabajo de Ferrer *et al.* (2007): i) los tiempos de retención y las características de diseño del proceso; ii) la composición del agua residual y de las bacterias presentes; y iii) las relaciones interespecíficas entre bacterias-protistas y protistas-protistas (competencia, predación). Al observar estas características y presentar relación con las variables de funcionamiento del reactor, los protistas y metazoos pasaron a ser considerados como una herramienta fundamental en el diagnóstico de los fangos activados al ser indicadores del proceso de depuración.

Gracias al potencial indicador de las condiciones de operación, algunos investigadores se han centrado en evaluar la relación entre protistas y parámetros operacionales (Esteban *et al.*, 1991; Salvado & Gracia, 1993; Lee *et al.*, 2004; Dubber & Gray, 2011; Hu *et al.*, 2012; Zornoza, 2017).

Varios autores habían observado una relación entre la presencia de protistas y la eficiencia del proceso de depuración. Pero no fue hasta 1968 cuando Curds y colaboradores, demostraron la función relevante de los protistas en la depuración, observando un efecto depredador sobre las bacterias libres que disminuía la turbidez del efluente y, por consiguiente, aumentaba considerablemente los rendimientos del proceso.

Hamm (1964) fue, probablemente, el primer autor en asociar la nitrificación en fangos activados con la presencia de determinados protistas, observando un aumento de la densidad de *Aspidisca* sp. al aumentar el proceso de nitrificación. En el estudio llevado a cabo por Poole (1984), en el que se incluían un total de 13 EDAR, se llevó a cabo el primer estudio comparativo de la microfauna (protistas y metazoos) entre plantas con proceso y sin proceso de nitrificación. Logrando determinar el valor indicador de algunas especies y géneros de protistas y metazoos respecto al proceso de nitrificación, encontrando, por ejemplo, a *Drepanomonas revoluta*, *Acineria uncinata* y *Opercularia coarctata* como especies típicas de plantas no nitrificantes.

Posteriormente, en 1993, Madoni y colaboradores asociaron la nitrificación con algunas variables del proceso y fisicoquímicas del afluente, licor mezcla y protistas a partir de un análisis factorial. Dichos autores concluyeron que la elevada concentración de los sólidos suspendidos del licor mezcla (SSLM), oxígeno disuelto (OD), TRH del reactor y baja CM favorecían el rendimiento del proceso de nitrificación.

El rendimiento del proceso de nitrificación se encuentra directamente condicionado por las variables operacionales y fisicoquímicas de las EDAR. De igual forma, la dinámica poblacional de los microorganismos se encuentra influenciada por dichas variables de control del proceso. Al considerar conjuntamente ambos pares de relaciones, entonces los protistas y metazoos podrían ser buenos bioindicadores del rendimiento del proceso de eliminación del nitrógeno

(Zornoza, 2017). Este valor bioindicador ha sido base de diferentes estudios donde se ha explorado la relación entre protistas y componentes del nitrógeno (Papadimitriou *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008; Pérez-Uz *et al.*, 2010; Zornoza *et al.*, 2012, 2017). A excepción de algunos estudios, se observa generalmente el empleo de un número reducido de criterios para la selección de los componentes del nitrógeno que mejor explican las variables biológicas.

Los bioindicadores no pueden ser considerados únicamente como criterio de seguimiento de las EDAR, estos son útiles, pero cada depuradora posee características de diseño y composición del afluente concretas, lo cual puede provocar estructuras poblacionales particulares. De este modo, el seguimiento diario de un reactor y la interpretación del estado del proceso a partir de la microfauna, también debe estar apoyado en la aproximación estadística de las variables, con el empleo de los análisis multivariantes. Por otro lado, hasta el momento, son escasos los trabajos realizados empleando rutinas estadísticas multivariantes para determinar los componentes del nitrógeno más significativos y que mejor explican la respuesta de las variables biológicas (Jaromin-Glen *et al.*, 2013; Zornoza, 2017).

Algunos autores, como Esteban *et al.* (1990) y Al-shahwani *et al.* (1991), han sido quizás los primeros en aplicar análisis de regresión múltiple y bivariado, incorporando algunas variables de planta, como son, la concentración de SSLM, el IVF y la CM. Sin embargo, el número de variables ambientales utilizadas en los trabajos publicados para explicar la variabilidad biológica en fangos activados ha sido baja (entre 2-7). Dos trabajos que hasta el momento han explorado un mayor número de variables ambientales (12) han sido los realizados por Martín *et al.* (1995) y Esteban *et al.* (1991), siendo este último uno de los primeros estudios en utilizar el análisis de componentes principales para la búsqueda de asociaciones entre ciliados y variables de control de las plantas depuradoras. Otros trabajos en los que también se aplicaron metodologías multivariantes fueron los correspondientes a Cingolani *et al.* (1992); Cossignani *et al.* (1992), Madoni *et al.* (1993), Becarés, (1994), Guckert *et al.* (1996) y Zornoza, (2017).

1.5 El nitrógeno en las aguas residuales

El nitrógeno se encuentra presente en toda la biosfera, formando parte de una variedad de compuestos, debido a los diferentes estados de oxidación que puede asumir (tabla 1.2.). Son diversas las fuentes de donde provienen las cargas contaminantes de nitrógeno, especialmente de origen antropogénico, desde industrias petroquímicas, farmacéuticas, de fertilizantes, alimentarias, por lixiviados producidos en los vertederos de residuos sólidos urbanos y por purines de residuos producidos en las granjas de cerdos (EPA, 2006).

En el medio acuático el nitrógeno se encuentra generalmente en forma de amonio, urea, ácido úrico, proteínas, azúcares aminados y aminas, entre otros. El nitrógeno orgánico es transformado a ion amonio gracias a la acción bacteriana. Como consecuencia de la actividad de los microorganismos proteolíticos, las proteínas son degradadas hasta aminoácidos, y a su vez la degradación de los aminoácidos para formar nitrógeno amoniacal es realizada por los organismos amonificantes (Catalán, 1997).

Normalmente, en las aguas residuales urbanas el nitrógeno se encuentra principalmente en su forma reducida como nitrógeno orgánico y amoniacal, como NH_3 (amoníaco disuelto) y

NH_4^+ (ion amonio), siendo esta última la forma predominante en las aguas residuales debido al pH característico de las mismas, mientras que la presencia de las formas nítricas y nitrosas es inferior a un 1% (EPA, 1993). El ion nitrito y su forma no ionizada, el ácido nitroso (HNO_2), están interrelacionados a través del equilibrio químico (Russo, 1985), dependiendo igualmente del pH del agua.

Tabla 1.2 Compuestos nitrogenados y estados de oxidación. Fuente: EPA (1993)

Compuesto de nitrógeno	Fórmula	Estado de oxidación
Amoniaco	NH_3	-3
Ion Amonio	NH_4^+	-3
Nitrógeno Gas	N_2	0
Ion nitrito	NO_2^-	+3
Ion nitrato	NO_3^-	+5

1.5.1 Impactos ambientales asociados al nitrógeno

La acumulación excesiva de compuestos de nitrógeno, fruto de la contaminación antrópica en las aguas superficiales y subterráneas, han hecho evidentes los impactos ambientales, de salud pública y económicos. Varios efectos atribuibles al nitrógeno pueden originarse a partir de las descargas de aguas residuales municipales, como la acidificación de cuerpos de agua, la toxicidad por compuestos nitrogenados, la eutrofización, la proliferación de algas tóxicas y el agotamiento directo e indirecto del oxígeno disuelto (OD) en las aguas receptoras (EPA, 1993).

Interacciones entre compuestos, como dióxido de azufre (SO_2) y los óxidos de nitrógeno (NO^+ , NO_2^-) con otras moléculas (O_3 , OH^+ , H_2O), pueden generar ácido sulfúrico (H_2SO_4) o ácido nítrico (HNO_3). Al entrar en contacto con el agua, estos ácidos pueden incrementar la concentración de sulfatos (SO_4^{2-}) y protones (H^+) y, como consecuencia, disminuir el pH del agua (Schindler, 1988; Baker *et al.*, 1991).

La carga externa de nitrógeno (N) y fósforo (P) sobre los ecosistemas acuáticos se derivan de fuente puntuales y difusas provenientes de la atmósfera, de aguas subterráneas y pluviales. Este aporte de elementos influye fuertemente en el crecimiento de algas y plantas vasculares en ecosistemas marinos y de agua dulce, contribuyendo a la eutrofización de los ecosistemas acuáticos (Smith *et al.*, 1999). La eutrofización puede generar un deterioro en la apariencia de aguas previamente transparentes (turbidez), problemas de olor debido a la descomposición plantas y una disminución en la concentración del OD, que puede afectar adversamente la respiración de los peces, los animales acuáticos bentónicos y el crecimiento de las plantas del lecho (EPA, 1993).

El amoniaco libre disuelto en agua (NH_3) es uno de los peores contaminantes para la vida acuática (Effler *et al.*, 1990). Niveles por encima de 0,2 mg/l de amoniaco libre disuelto en agua son extremadamente tóxicos para la vida acuática y producen una acusada disminución del oxígeno disuelto en el agua (Carrera, 2004). Las causas por las cuales el NH_3 resulta tan perjudicial para la vida acuática han sido descritas por Camargo & Alonso (2006), y pueden deberse a una o varias de estas razones: i) destrucción del epitelio branquial; ii) estimulación de la glucólisis y su presión del ciclo de Krebs; iii) inhibición de la producción de ATP y

reducción de sus niveles; iv) alteración de la actividad osmorreguladora, v) disrupción del sistema inmunológico.

El NO_2^- es altamente tóxico, su principal efecto tóxico en animales acuáticos se da por la conversión de los pigmentos respiratorios en formas que son incapaces de transportar y liberar oxígeno, lo cual puede ocasionar asfixia y muerte. Este efecto también lo produce el NO_3^- , pero este presenta una menor toxicidad dada su baja permeabilidad branquial (Camargo & Alonso, 2006).

Por otra parte, la ingesta de aguas contaminadas con NO_2^- y NO_3^- puede generar efectos adversos sobre la salud humana, pudiendo contribuir al desarrollo de infecciones del tracto respiratorio, malformaciones, enfermedades coronarias, linfomas y cáncer. En bebés puede ocasionar metahemoglobinemia, generando efectos de taquicardia, convulsiones, asfixia e incluso la muerte (Fwetrell, 2004). Se han reportado numerosos casos de metahemoglobinemia alrededor del mundo desde 1945. Estos han estado siempre relacionados con el consumo de agua proveniente de pozos con niveles de concentración de nitrato superior a 10 mgN/l (Wolfe, 2002).

En consecuencia, la eliminación de nitrógeno amoniacal de las aguas residuales está explícitamente exigida por la Directiva de tratamiento de aguas residuales urbanas (CEC, 1991). Dada la importancia de eliminar las cargas de nitrógeno en las corrientes de agua residual, el proceso biológico de nitrificación-desnitrificación se ha convertido en el más empleado en las EDAR para la eliminación de este contaminante (Carrera, 2004).

1.5.2 Eliminación biológica del Nitrógeno

En el reactor biológico de un sistema tradicional de fangos activados, el mecanismo más empleado para la eliminación de nitrógeno es el proceso biológico en dos etapas: nitrificación-desnitrificación. Se han definido tres grupos de bacterias dentro de estos procesos para la eliminación del nitrógeno: 1) la primera es la biomasa autótrofa amoniooxidante, que oxida el nitrógeno amoniacal a nitrito, proceso conocido como nitrificación; 2) la segunda es la biomasa autótrofa nitritooxidante, que oxida el nitrito a nitrato, proceso conocido como nitratación. Estos dos primeros grupos llevan a cabo los procesos en condiciones aerobias usando oxígeno como aceptor de electrones. Finalmente, 3) la biomasa heterótrofa desnitrificante reduce el nitrógeno oxidado, usando nitrato (o nitrito) como aceptor de electrones a nitrógeno molecular en condiciones anóxicas con una fuente de carbono orgánico (Ismail, 2008); proceso realizado principalmente por bacterias heterótrofas facultativas, aunque existen algunas bacterias autótrofas que también son capaces de hacerlo (Ferrer & Seco, 2007).

Las transformaciones que tienen lugar en el proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato en las EDAR se encuentran representadas en la figura 1.2.

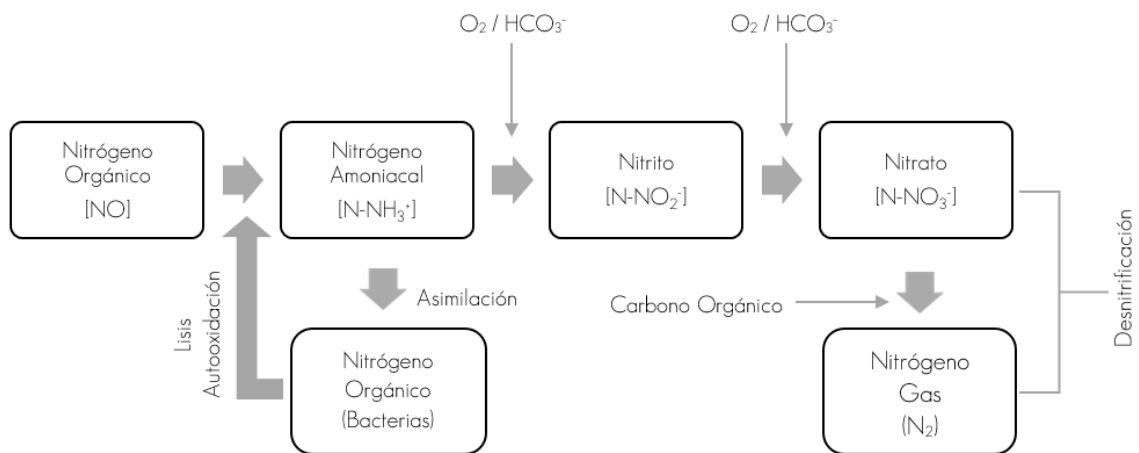


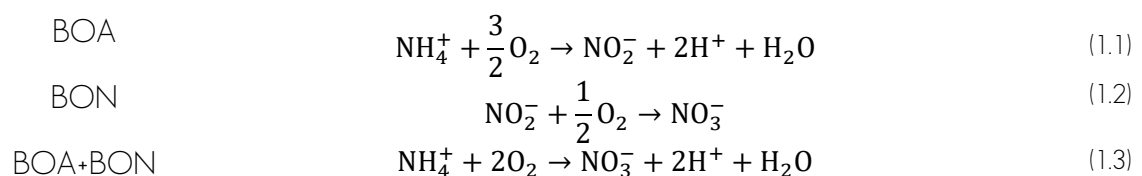
Figura 1.2 Esquema del proceso de nitrificación y desnitrificación. Fuente: (Tchobanoglous, *et al.*, 2003)

De ambos procesos, la nitrificación es el más complejo de diseñar y controlar, puesto que es un proceso lento e inestable debido a la sensibilidad de las bacterias nitrificantes a factores como la temperatura, el nivel de oxígeno disuelto, el pH y la presencia de inhibidores (Wang *et al.*, 2009).

La nitrificación es la oxidación biológica del amoníaco a nitrato. Hay dos grupos de bacterias filogenéticamente diferentes que colectivamente realizan la nitrificación. Por lo tanto, este proceso puede considerarse en un proceso de dos etapas. Las BOA, incluyendo las AOA, realizan la nitrificación, y las BON, realizan la nitratación (Guisasola, 2005).

En el primer paso del proceso, las BOA transforman el amonio a nitrito. Para ello, son necesarias dos enzimas encargadas de catalizar el proceso: el amonio monooxigenasa (Holloche *et al.*, 1981) que es la responsable de la oxidación del amonio a hidroxilamina, y la oxidorreductasa hidroxilamina (Olson & Hooper, 1983), que controla la oxidación de la hidroxilamina a nitrito.

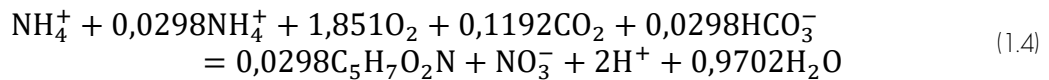
El nitrito es posteriormente oxidado a nitrato por las BON, proceso de nitratación (Bock *et al.*, 1992). Esta reacción es catalizada por la enzima nitrito oxidorreductasa (Bock & Wagner, 2006) para el género *Nitrobacter*, mientras que para el resto de BON es catalizada por la enzima denominada sistema nitrito-oxidante. El proceso de nitrificación se resume en las siguientes reacciones:



En el balance total de la reacción se produce energía, que es utilizada por los microorganismos para sus funciones de crecimiento y mantenimiento celular; siendo el N-NH_4^+ la forma preferente de nitrógeno para la síntesis celular. Por ello, una fracción del amonio presente es consumido por las BOA y BON para crecimiento celular (Rittmann & McCarty, 2001). De este modo, diferentes autores han estudiado la reacción de síntesis que tiene lugar

en toda la reacción global del proceso de conversión del ion amonio a nitratos mediante relación estequiométrica, con la cual puede estimarse los coeficientes de absorción de oxígeno y de rendimiento de biomasa específicos para la nitrificación (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Autores como Crites & Tchobanoglous (1998) y Liu (2012) han estimado la fracción de electrones utilizada para la síntesis celular, encontrando que un 5% y 2,9% de electrones, respectivamente, están ligados a la síntesis celular.

En teoría, se necesitan 4,57g de oxígeno para oxidar por completo 1 g de nitrógeno en forma de amonio en nitrato, con 3,43 gO₂/gN para la primera etapa de las BOA y 1,14 gO₂/gN para la segunda etapa por las BON (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Sin embargo, autores como Werzernak & Gannon (1967) y Liu (2012) han obtenido valores inferiores a los teóricos, 4,23 y 4,33 gO₂/gN, respectivamente. Esto se debe a que una pequeña cantidad de amonio, así como pequeñas fracciones de electrones derivados de la oxidación de amonio y reacciones de oxidación de nitrito, se utilizaron para la síntesis celular, lo que resulta en una demanda de oxígeno menos específica que los valores teóricos antes mencionados. Como reacción global del proceso de nitrificación, Liu (2012) ha propuesto la siguiente reacción:



De acuerdo a la ecuación anterior, se observa que la oxidación del amonio consume una fuente de carbono inorgánico (CO₂/HCO₃⁻), cuya concentración en la mayoría de reactores biológicos no es limitante. Sin embargo, la nitrificación produce H⁺, lo que conlleva un consumo de alcalinidad del medio y, por consiguiente, requiere de un control sobre este valor. En concreto, la alcalinidad requerida para la oxidación de amoníaco es de 7,22 gCaCO₃/gN oxidado. Este valor incluye la cantidad de alcalinidad necesaria para neutralizar el ácido producido (nitrito de hidrógeno) y el necesario para sintetizar el amoníaco. Para la siguiente etapa de oxidación del nitrito se requieren de 0,03 gCaCO₃/gN oxidado. Considerando la fracción de nitrógeno empleada para la síntesis celular durante el proceso de nitrificación, la alcalinidad demandada sería de 7,04 gCaCO₃/gN (Liu, 2012).

1.5.3 Variables que afectan al proceso de nitrificación

El parámetro clave en un proceso biológico con eliminación de nutrientes es la velocidad de nitrificación, dado que este proceso, llevado a cabo por las bacterias nitrificantes, está limitado por el lento metabolismo de estos microorganismos. Por esa razón, es importante conocer experimentalmente la velocidad máxima de nitrificación en las condiciones reales de operación (Carrera, 2004).

Hay una gran cantidad de parámetros de operación que inciden sobre la velocidad de nitrificación, siendo la temperatura uno de los que más afecta (Harremoës *et al.*, 1998). Existen numerosas expresiones matemáticas para describir el efecto de la temperatura sobre la velocidad de nitrificación (Stark, 1996), siendo una de las más importantes, conocidas y comúnmente empleadas en el campo químico, la ecuación de Arrhenius.

$$r_{N,T_i} = r_{N,T_2} * \theta^{(T_i - T_2)} \quad (1.5)$$

Donde r_{N,T_i}=velocidad de nitrificación a la temperatura T_i en kgN-NH₄⁺/kgSSVd; θ = factor de temperatura, valor habitual 1,111 (Henze, *et al.*, 1995)

La temperatura influye de manera significativa en la velocidad de nitrificación, sin embargo, esta influencia varía considerablemente en función de las condiciones de operación del sistema biológico y de las características del agua residual tratada. Por tanto, cuando se utiliza el efecto de la temperatura sobre la velocidad de nitrificación como parámetro de diseño, hay que determinar dicho efecto sobre un sistema con condiciones similares a las de la planta depuradora que se diseña (Carrera, 2004). Por otro lado, las BOA tienen tasas de crecimiento mayores a partir de 20 °C que las BON, pero inferiores a 15 °C comparadas con estas (figura 1.3). Esto ocasiona una diferencia entre las tasas de crecimiento de ambos grupos de bacterias, suponiendo acumulación de nitrito a temperaturas mayores de 20°C o acumulación de amoníaco a temperaturas inferiores de 15 °C, pudiendo producir un efecto inhibitorio por especies de nitrógeno cuando no se compensa correctamente el TRC (Hellinga *et al.*, 1998; Carrera, 2004).

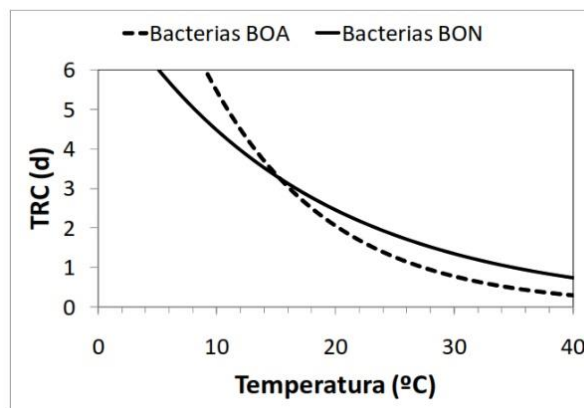


Figura 1.3 TRC mínimo para BOA y BON en función de la temperatura. Fuente Hellinga *et al.* (1998).

La relación entre la demanda química de oxígeno y el nitrógeno en el afluente (DQO/N) es un parámetro importante en el proceso de nitrificación, puesto que determina la competencia en el crecimiento que se da entre las poblaciones de microorganismos autótrofos y heterótrofos (Cheng & Wen-Chin, 1994). En los estudios realizados por Carrera (2004), se ha encontrado que la velocidad de nitrificación y la fracción de bacterias nitrificantes son menores en sistemas con mayor relación DBO₅/N.

El pH influye directamente sobre el crecimiento de las bacterias nitrificantes. Existe un amplio rango de pH óptimo reportado en la bibliografía. Sin embargo, se sabe con firmeza que un descenso en el pH ocasiona un descenso en la velocidad de nitrificación. El rango óptimo de pH para BOA está entre 8,5 y 8,8, mientras que para las BON se encuentra entre 8,3 y 9,3 (Shammas, 1986).

La nitrificación también está inhibida por sus propios sustratos, amonio y nitrito, debida a las formas no ionizadas de estos, amoníaco (NH₃) y ácido nitroso (HNO₂). Las BOA y BON se ven influenciadas por la concentración de estos compuestos, estando influenciados por el pH y la temperatura del reactor, los cuales establecen el equilibrio con el NH₄⁺ (Kim *et al.*, 2006). Anthonisen *et al.* (1976) encontraron que las BON son más sensibles al NH₃ en el rango de 0,1 - 1,0 mg/l, mientras que las BOA están inhibidas en el rango de 10 - 150 mg/l. Además, han encontrado que las BOA se ven afectadas por NH₃, mientras que las BON lo hacen tanto por el NH₃ como por el HNO₂, sin descartar una posible inhibición por HNO₂ sobre las

BOA. Por otro lado, Qian *et al.* (2017) han demostrado que la presencia de amonio libre puede reducir la actividad de las BON en un 15,6% y en un 4,9% para las BOA, indicando que la actividad de ambas disminuye al aumentar la concentración de amonio libre, teniendo una mayor sensibilidad las BON en las condiciones en que fue llevado a cabo dicho estudio.

Otro parámetro que afecta a la actividad de las bacterias nitrificantes es el oxígeno disuelto (OD), dado que estas son bacterias estrictamente aerobias, y requieren O_2 como aceptor de electrones para la oxidación del $N-NH_4^+$ hasta $N-NO_3^-$. El OD no genera inhibición, pero puede convertirse en un factor limitante para el crecimiento de las bacterias y generar una nitrificación parcial. Además, se puede dar una ventaja competitiva a las BOA sobre las BON (Sinha & Annachatre, 2007). Se ha demostrado que las bacterias oxidantes de nitrito tienen una menor afinidad por el oxígeno que las bacterias oxidantes de amoníaco. La oxidación de nitrito puede inhibirse a OD de 0,5 mg/l, mientras que esto no ocurre sobre la oxidación de amoníaco (Kim *et al.*, 2008).

La concentración óptima de OD que usan la mayoría de EDAR para lograr una nitrificación completa se sitúa en 2 mg/l (Tchobanoglous *et al.*, 2003), convirtiendo este en un factor importante que contribuye a los costos operativos (Park & Noguera, 2004). Sin embargo, Park & Noguera (2004) sugieren en su estudio que puede llevarse a cabo una nitrificación con valores inferiores a estos (0,12 mg/l), combinando un sistema óxico-anóxico en donde las BOA presentan una alta afinidad del oxígeno. Por otra parte, los autores Jianlong & Ning (2004) hacen referencia a que la tasa máxima de oxidación de amoníaco se da en una concentración de OD de 1,5 mg/l, sin encontrar una mayor variabilidad cuando se incrementa a 2,5 mg/l, según las condiciones experimentales.

La carencia de una buena difusión de oxígeno a través de los flóculos y la competencia en el consumo de oxígeno por otros organismos aerobios generan una limitación de la disponibilidad del OD para el proceso de nitrificación. El aumento de la concentración de OD puede acelerar la nitrificación, permitiendo una mejor penetración de este en los flóculos y, por lo tanto, su acceso a las bacterias nitrificantes (Gerardi, 2002). El efecto del OD sobre el crecimiento máximo de la nitrificantes suele expresarse mediante una doble cinética de Monod que establece dicho crecimiento en función de la concentración de OD y $N-NH_4^+$ (Randall *et al.*, 1998):

$$\mu_m = \frac{(\mu_m, \max)N}{K_n + N} \left[\frac{DO}{K_o + DO} \right] \quad (1.6)$$

Donde μ_m = velocidad de crecimiento específico (g célula producida. g célula/d); K_n = constante de semisaturación del $N-NH_4^+$ (mg/l); K_o = constante de semisaturación del oxígeno (mg/l).

La tasa de nitrificación a veces se reduce severamente en presencia de alto contenido orgánico y componentes inhibidores. Los microorganismos nitrificantes se caracterizan por ser muy sensibles a numerosas sustancias tóxicas, en donde el efecto tóxico puede presentarse de diferentes formas, pudiendo provocar una disminución en la velocidad de nitrificación, o una toxicidad suficiente para eliminar y detener el proceso de nitrificación (Randall, *et al.*, 1998). Diversos autores han estudiado la inhibición del proceso de nitrificación por sustancias tóxicas, encontrando perjudiciales a ciertos metales y compuestos inorgánicos: cinc, cobre y níquel (Grunditz *et al.*, 1998), cianuro y cobre (Kong *et al.*, 1996), cadmio, plomo y níquel (You *et al.*,

2008), arsénico, cromo y fluoruro (Beg *et al.*, 1982). También se ha observado toxicidad debido a las siguientes sustancias orgánicas: cloroformo, fenol, tiourea, hidracina, hexametildiamina, etanol, etilendiamina, anilina y otros (Hockenbury & Grady, 1977a, 1977b), acetona y metanol (Oslislo & Lewandowski, 1985), cromo y cloro (Orhon *et al.*, 2000).

1.6 La respirometría, técnica para el seguimiento y evaluación del proceso de nitrificación

La respirometría es la medición e interpretación de la tasa de consumo de oxígeno biológico en condiciones experimentales bien definidas (Spanjers *et al.*, 1996). La tasa de consumo está relacionada con la capacidad de eliminación de un sustrato y el crecimiento de la biomasa, es decir, su cinética. Estos son dos de los parámetros más importantes cuando se trata de monitorizar el proceso de fangos activados. Ambos elementos están directamente relacionados con el consumo de oxígeno, sin embargo, la medición directa de la respiración de la biomasa no es posible y la concentración de oxígeno solo se puede medir en el gas o en la fase líquida (Guisasola, 2005). Por lo tanto, la tasa de consumo de oxígeno de la biomasa es un indicador indirecto tanto de la eliminación del sustrato como de los procesos de crecimiento.

En términos bioquímicos, la respiración es el proceso metabólico mediante el cual se da la formación de ATP, empleando compuestos orgánicos o inorgánicos como donadores de electrones y compuestos inorgánicos como O_2 , NO_2^- , NO_3^- y SO_4^{2-} como aceptores de electrones. La energía generada es empleada por las bacterias para la síntesis los componentes moleculares requeridos para el crecimiento y la reproducción celular. Para las bacterias heterótrofas, solo una porción ($1-Y$) del sustrato orgánico consumido se oxida para proporcionar energía. El resto de las moléculas del sustrato (el rendimiento, Y) se emplean para formar nueva biomasa, mientras que las bacterias nitrificantes solo emplean una pequeña parte del sustrato (S_{NH}) para síntesis celular, siendo la mayoría de este oxidado para la producción de energía (Vanrolleghem, 2002).

Los microorganismos son el eslabón del proceso de la depuración del ARU y en muchos otros casos de ARI, pues la mayor carga contaminante presente en los vertidos es de materia orgánica y compuestos inorgánicos, como el amonio. Es aquí donde la técnica respirométrica entra a ser una herramienta factible para analizar cualitativa y cuantitativamente la actividad de la biomasa y, con ello, el estado del proceso de depuración. Por tanto, la respirometría permite conocer el estado de la biomasa y su variabilidad a escala espacial y temporal, de modo que se puedan relacionar con las variaciones ambientales y operacionales de la planta.

Los análisis respirométricos permiten adquirir datos sobre el consumo de oxígeno en respuesta a la metabolización de un sustrato por parte de los microorganismos. Sin embargo, existe un consumo de oxígeno asociado al mantenimiento celular denominado respiración endógena. Esta puede definirse, en términos operacionales, como la tasa de consumo de oxígeno en ausencia de sustrato desde una fuente externa, es decir, la energía asociada para auto digerir los compuestos de almacenamiento interno (Davies & Murdoch, 2002). Aquí se incluye, además, no sólo el consumo por mantenimiento celular y lisis de crecimiento, sino también un consumo de oxígeno asociado a protozoos. Todos los procesos que tienen un consumo de oxígeno aportan a la tasa de respiración total. Esto hace que en algunos casos sea difícil

distinguir el consumo de oxígeno debido a un proceso biológico en particular, es decir, pueden existir organismos diferentes a los estudiados o compuestos que se oxiden en presencia de oxígeno, alterando la tasa de respiración que se mida del grupo de bacterias estudiadas (Vanrolleghem, 2002).

La tasa de respiración y la concentración de OD presentan una fuerte relación. Este último se puede medir de manera relativamente fácil y confiable, y en algunos casos este valor es usado para el control del proceso biológico de fangos activados. Sin embargo, este valor por sí mismo no proporciona suficiente información sobre el crecimiento y la utilización del sustrato per se.

La tasa de respiración puede ser expresada matemáticamente en términos de crecimiento y decaimiento de la biomasa heterótrofa y autótrofa de acuerdo a la ecuación 1.7 (Spanjers *et al.*, 1996).

$$r_o = \frac{1 - Y_H}{Y_H} \mu_H(S_s, S_o)X_H + \frac{4,57 - Y_N}{Y_N} \mu_N(S_{NH}, S_o)X_N + [1 - f'_p][b_H(S_o)X_H + b_N(S_o)X_N] \quad (1.7)$$

Donde Y=rendimiento de bacterias heterótrofas (H) o nitrificantes (N); μ =tasa específica de crecimiento de la biomasa heterótrofa (H) o nitrificante (N); S_s =sustrato rápidamente biodegradable; S_o =oxígeno disuelto; S_{NH} =amonio; X=biomasa heterótrofa (H) o nitrificante (N); $(1 - f'_p)$ =fracción de biomasa en condiciones endógenas utilizando oxígeno. La tasa de crecimiento específica de ambas bacterias depende de la concentración de oxígeno y sustrato, y la tasa de decaimiento solo del oxígeno.

1.6.1 Utilidad de la respirometría en la depuración de las aguas residuales

Desde su implementación, la técnica de la respirometría ha sido ampliamente utilizada como herramienta para la caracterización de aguas residuales, la evaluación de la actividad biológica de fangos activados y la calibración de modelos matemáticos (Spanjers & Vanrolleghem, 1995). Esta técnica mide el consumo de oxígeno por parte de la biomasa, al degradar los sustratos en relación al tiempo, lo cual proporciona una información muy precisa, tanto de la actividad de los organismos como de la velocidad a la que los diferentes sustratos son consumidos. La tasa de respiración es la velocidad de consumo de oxígeno, por unidad de volumen y tiempo. Además, puede usarse como variable de interés para indicar alteraciones o activar alarmas, no siendo únicamente su aplicación. Esta puede ser empleada para definir más variables de interés (Spanjers *et al.*, 1998).

El grupo de trabajo en control de procesos de fangos activados en respirometría del IWA (2002) ha definido cuatro propósitos de investigación mediante dicha técnica:

- a. **Calidad del efluente:** reducción de la carga contaminante en el efluente final, expresada en términos de concentración de contaminante o carga.
- b. **Variabilidad:** reducir la variabilidad de la carga contaminante al final del efluente, expresada en términos de alguna variable medible (varianza, desviación estándar, etc.) de la concentración del contaminante o de su carga.
- c. **Ahorro energético:** reducción del consumo de energía en la planta, principalmente asociado con la aireación, con el bombeo del retorno de fango y del sobrenadante.

- d. **Mitigación de la toxicidad:** reducir el impacto negativo con la entrada de algún tóxico, expresado en el deterioro de la calidad del efluente, disminución de la actividad de la biomasa, entre otros. Evaluar la toxicidad del efluente sirve de gran aliciente para el control del cumplimiento de los niveles de vertido, dado que, al ingresar algún compuesto tóxico al reactor biológico este inhibirá a la biomasa, ocasionando que la calidad de efluente disminuya o no cumpla con los lineamientos normativos.

La respirometría además es una técnica útil empleada para la monitorización de la actividad de la biomasa, la caracterización del agua residual y la estimación de parámetros de los modelos biológicos de acuerdo a Davies & Murdoch (2002), Young & Cowan (2004), ya que permite:

- Valorar de forma práctica y rápida cómo se encuentra el estado actual del proceso.
- Determinar la capacidad de oxidación de materia orgánica, nitrificación y desnitrificación mediante la tasa de consumo de oxígeno en efluentes domésticos e industriales.
- Determinar la biodegradabilidad y las fracciones biodegradables de la DQO.
- Determinar la influencia tóxica y el poder inhibitorio de algunos compuestos sobre las poblaciones microbiológicas en las plantas de tratamiento de aguas residuales.
- Determinar la efectividad de cultivos microbiológicos y su comportamiento en la digestión de algún sustrato en particular.
- Determinar las características de biodegradación de un agua residual o sustancia química.
- Determinar los parámetros cinéticos para las reacciones de biodegradación.

Las principales razones para emplear las técnicas respirométricas de acuerdo a Douglas (2010) y Sakhraoui *et al.* (2017), son las siguientes:

- Junto a la microscopía, facilita el conocimiento de los microorganismos presentes en los procesos de fango activo.
- La respirometría es una técnica sencilla, rápida, no contaminante y asequible.
- Permite evaluar el efecto de un proceso biológico, lo cual no sería sólo posible con medidas físicas o químicas: se necesitan parámetros derivados de la propia biomasa (fango activo), y esto sólo se consigue con la respirometría.
- Se puede analizar el efecto que el sustrato presente en un agua residual tiene sobre la biomasa.
- Permite evaluar y monitorizar los procesos que tienen lugar en la depuración de aguas residuales de forma sencilla y eficiente.
- Permite optimizar los parámetros de operación del proceso y las posibilidades de un ahorro energético.
- Da un soporte fundamental a programas de simulación de procesos de depuración.

La técnica respirométrica ha sido ampliamente usada en las últimas décadas para múltiples propósitos. Autores como Čech *et al.* (1985), Kappeler & Gujer (1992), Drtil *et al.* (1993), Vanrolleghem *et al.* (1994), Spanjers & Vanrolleghem (1995), Surmacz-Gorska *et al.* (1996),

Melcer (2004) y Guisasola (2005) han empleado la técnica respirométrica para estudiar el proceso de nitrificación, evaluando la actividad de bacterias nitrificantes en fangos activados y determinando los valores estequiométricos y cinéticos de bacterias heterótrofas y autótrofas, principalmente, con el fin de calibrar los modelos del proceso biológico.

Diversos investigadores han estudiado la influencia de las variables ambientales sobre el proceso de nitrificación mediante técnica respirométrica. Carrera (2004) estudio el efecto de la relación DQO/N y T^a en el afluente sobre la nitrificación. Douglas (2010) en su estudio se basó en técnica respirométrica para calibrar un modelo matemático del proceso de nitrificación en un sistema SHARON. Por medio de la respirometría, determinó los parámetros cinéticos y estequiométricos de BOA y BON, y evaluó los efectos de diferentes variables en el proceso (T^a , pH, inhibición por NH_3 y HNO_2 , etc.). Liu (2012) estudio el efecto del tiempo de retención celular y la concentración de oxígeno disuelto sobre las bacterias nitrificantes, además de obtener parámetros estequiométricos y cinéticos.

Los estudios reportados en la bibliografía sobre el proceso de nitrificación, empleando técnica respirométrica, se han basado principalmente en conocer el efecto que puedan tener las VOP y VFO, como T^a , pH, OD, TRC, S_{NH} sobre el proceso. No han sido reportados estudios publicados que relacionen mediante análisis bivariente ni multivariado las relaciones entre el conjunto de las variables que se han considerado en este estudio, como son: variables operacionales, variables fisicoquímicas, bioindicadores y variables respirométricas, por lo cual resulta de gran interés para desarrollar nuevas estrategias de seguimiento y control en las EDAR.

1.6.2 Respirómetro

El dispositivo experimental empleado en la determinación de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR, *oxygen uptake rate*) recibe el nombre de respirómetro, y el perfil de oxígeno disuelto (OD) frente al tiempo registrado por dicho dispositivo se denomina respirograma. Un respirómetro es un instrumento con variabilidad de configuraciones, que van de modelos simples operados manualmente hasta equipos complejos y automáticos. Sin importar el tipo, se caracterizan por poseer un pequeño reactor biológico con un sensor de oxígeno para medir el diferencial en la concentración del OD respecto al tiempo. Los respirómetros modernos vienen equipados de módulos de control y software integrado para generar los respirogramas de cada ensayo, equivalentes a la velocidad de consumo de oxígeno de la población microbiana presente en las condiciones del ensayo. Existen diferentes configuraciones de operación de un respirómetro en función de la forma que ingresa el oxígeno al reactor: en línea, in situ, continuo, semicontinuo, por lotes, etc. (Vanrolleghem, 2002). Las técnicas respirométricas han sido trabajadas y evaluadas por diversos autores, como Wezernak & Gannon (1967), Dochain *et al.* (1995), Guisasola (2005), Munz *et al.* (2011), Liu & Wang (2012), entre otros, por lo cual son bien conocidas e implementadas para monitorizar cualquier proceso aeróbico, que son los procesos más comunes en una EDAR típica (oxidación de la materia orgánica y nitrificación).

La noción de un respirómetro implica diferentes equipos con una característica común: reactores biológicos aireados con el objetivo de medir la tasa de consumo de oxígeno de una cierta biomasa. La clasificación actual de los respirómetros, según el grupo de Respirometría

de la International Water Association (IWA), se basa en tres características del funcionamiento del respirómetro, tal y como se muestra en la figura 1.4.

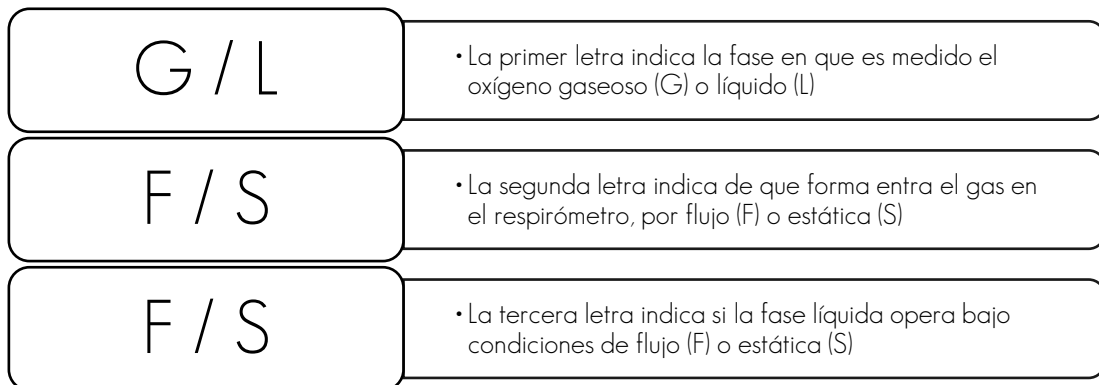


Figura 1.4 Clasificación de un respirómetro de acuerdo a la IWA

1.6.3 Tipo de ensayos respirométricos

Como se ha mencionado, la medición de la tasa de consumo de oxígeno en fase exógena (oxidación de sustrato para generación de energía y crecimiento celular) o fase endógena (mantenimiento celular, predación, muerte y lisis) no puede medirse de forma directa, aun así, esta puede ser medida indirectamente. En la mayoría de los respirómetros se emplea un sensor electroquímico de OD en fase líquida, y así poder medir de forma indirecta la relación entre el oxígeno aportado y la concentración de oxígeno acumulado o consumido (figura 1.5) para calcular posteriormente los parámetros de interés de acuerdo a la tasa de respiración registrada.

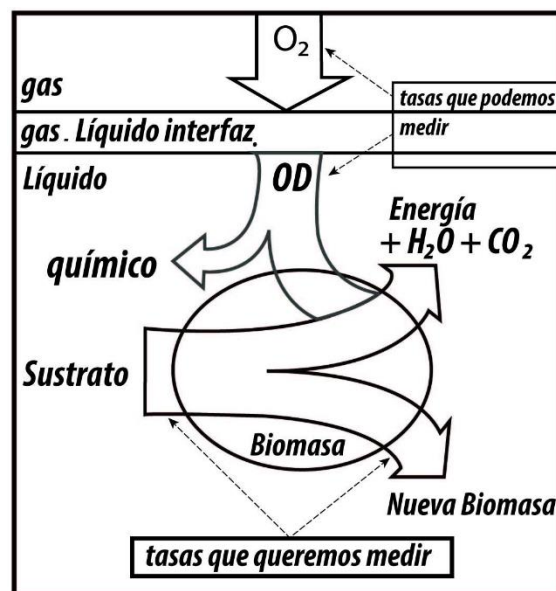


Figura 1.5 Relación entre respiración, oxidación del sustrato y crecimiento. Fuente: (Vanrolleghem, 2002)

El equipo respirométrico se basa en un sistema en discontinuo provisto de recirculación, en donde existen tres modos de trabajo: estático OUR, cíclico OUR y dinámico R. Estos difieren especialmente en la condición de operación de la aireación: sin aireación, aireación

intermitente y aireación continua, respectivamente. En la tabla 1.3. se presenta a modo de ejemplo algunas de las medidas que se obtienen con cada tipo de ensayo.

Tabla 1.3 Ensayos y medidas del equipo respirométrico

Tipo de Ensayo	Medida	Unidad	Descripción
OUR estático (A)	OUR	mg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de respiración global
	OUR _{end}	mg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹	Consumo de oxígeno debido a la desaparición de la biomasa por mantenimiento, predación y muerte
	SOUR	mg O ₂ SSV ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de respiración específica
OUR cíclico (B)	OUR	mg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹	Cadena de medidas secuenciales de OUR
	SOUR	mg O ₂ SSV ⁻¹ h ⁻¹	Cadena de medidas secuenciales de OUR
R dinámico (C)	Rs	mg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹	Medida continua de la tasa de respiración exógena con oxigenación continua.
	OC	mg O ₂ l ⁻¹	Consumo de oxígeno en la oxidación del sustrato

- A. El ensayo OUR estático opera en dos etapas simultáneas, la primera de ellas mantiene la recirculación interna, la aireación y agitación encendida para fijar el oxígeno inicial de referencia (Cb). En la segunda etapa, con la línea base de oxígeno fijada y grabado por el programa, se suspende la aireación y la recirculación, manteniendo sólo la agitación. A partir de este momento, el oxímetro registra automáticamente el descenso del oxígeno disuelto (Cs) en el reactor, debido al consumo por partes de la biomasa presente en el licor mezcla. Esto permite conocer la pendiente de la caída del oxígeno, o lo que es igual, la tasa de respiración global endógena de la biomasa.
- B. El modo OUR cíclico es un ensayo secuencial en el cual la aireación se da de forma discontinua entre un rango fijado, en donde la aireación se enciende en el valor mínimo de la consiga de oxígeno y se apaga en el máximo, registrando con esto la caída de oxígeno disuelto, ejecutándose secuencialmente ensayos OUR de forma automática. Este modo de ensayo se emplea como alternativa para conocer la tasa de nitrificación a las condiciones de operación en planta, la tasa de respiración endógena y el rendimiento de las bacterias nitrificantes, mediante la adición de sustrato.
- C. El modo R es un ensayo con aireación en continuo, empleado para determinar tasas de respiración máximas y rendimientos. Se trata de un sistema optimizado de respirometría del tipo LSF, según clasificación del organismo IWA, en donde se trabaja en fase líquida (L) en modo dinámico (F) y en condiciones de sistema abierto con oxigenación permanente (S), provisto de circuito de recirculación (SURCIS, 2003.). La tasa de respiración dinámica que se mide en este modo de trabajo es directamente la tasa de respiración exógena (Rs=OUR exógena), que depende exclusivamente de la demanda de oxígeno provocada por el sustrato.

II.OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este TFM se ha realizado en el marco del proyecto de investigación del grupo de Química y Microbiología del Agua del IIAMA, vinculada a la Universitat Politècnica de València, y la empresa DAM (Depuración de Aguas del Mediterráneo), para la EDAR Molina de Segura, en la cual se llevan a cabo estrategias de optimización para el proceso de nitrificación.

El TFM pretende desarrollar una investigación exploratoria sobre nuevas estrategias de monitorización del proceso de nitrificación en una EDAR con sistema de fangos activos mediante técnica respirométrica y bioindicación. El objetivo principal ha sido estudiar la variabilidad en las tasas de respiración de las bacterias nitrificantes y su relación con las variables operacionales, fisicoquímicas y biológicas (protistas y metazoos) de la EDAR Molina de Segura, determinando aquellas variables que explican de una forma significativa la actividad de la población de bacterias nitrificantes.

Los objetivos secundarios que se plantearon para lograr el objetivo general han sido:

1. Realizar una revisión bibliográfica de estudios respirométricos para generar un protocolo de ensayos equiparables durante el tiempo de estudio.
2. Medir la tasa de respiración de bacterias nitrificantes del licor mezcla de la EDAR de Molina de Segura, con una frecuencia semanal durante el período comprendido de noviembre de 2017 a junio de 2018.
3. Identificar protistas y metazoos como bioindicadores del proceso de nitrificación, mediante recuento directo con microscopía de contraste de fases.
4. Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos del proceso de nitrificación, empleando metodología de técnicas respirométricas.
5. Realizar un análisis estadístico avanzado para detectar los parámetros clave en el rendimiento y estabilidad del proceso de nitrificación.
6. Generar un modelo de predicción y monitorización del proceso de nitrificación para una EDAR con proceso de fangos activos.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describen las configuraciones experimentales, se especifican los ensayos ejecutados, las variables de interés y el tratamiento de datos para el presente trabajo de investigación.

3.1 Toma de muestras

Las muestras de fango activado fueron tomadas en la EDAR Molina de Segura perteneciente a la región de Murcia (España). La recolección de las muestras se realizó tomando una muestra puntual de 1 litro del licor mezcla (LM) con una frecuencia semanal de cada reactor, entre el período de noviembre de 2017 a junio de 2018. Previamente, se estableció el procedimiento y el punto de recolección de dichas muestras tomadas por un operario de planta.

La EDAR Molina de Segura sirve a 271.250 habitantes equivalentes, cuenta con un proceso biológico de fangos activados en flujo de pistón con esquema A/O, y eliminación de nitrógeno mediante alternancia de zonas anóxicas y óxicas, compuesto por dos reactores en paralelo y decantadores circulares. Posee un tratamiento terciario mediante coagulación-floculación y tratamiento de fangos. Además, cuenta con un sistema para el control de olores causados por sulfuro de hidrógeno, el cual se basa en la adición de cloruro férrico. En la figura 3.1. se muestra una vista aérea de la EDAR, el esquema detallado de la planta puede consultarse en el anexo 10.



Figura 3.1 Esquema de EDAR Molina de Segura. Fuente: Google Maps.

3.2 Variables operacionales y fisicoquímicas del agua residual

Los datos de las variables fisicoquímicas y operacionales que han sido consideradas en el presente estudio fueron facilitados por la EDAR, junto con las muestras de fango. Las variables operacionales de control del proceso biológico utilizadas en el presente estudio han sido las siguientes: carga másica (CM), tiempo de retención celular (TRC), tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr) y decantador secundario (TRHds). El valor de oxígeno disuelto ha sido calculado con base a los registros existentes, el cual fue en promedio de 2 mg/l durante el período de estudio. Las características generales de la planta y de las aguas residuales afluentes al reactor se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Caracterización del agua residual, configuración y variables operacionales en el reactor.

Parámetro	Unidades	Valor
Características del afluente		
Fósforo total	[mg/l]	5
Nitrógeno amoniacal	[mg/l]	43
Sólidos suspendidos totales	[mg/l]	6054
Demanda química de oxígeno	[mg/l]	966
Demanda bioquímica de oxígeno	[mg/l]	663
Caudales		
Caudal del afluente	m ³ /h	560
Recirculación de fangos	m ³ /h	1152
Volumen/Tamaño		
Calado	m	3,5
Reactor Aerobio	m ³	9600
Reactor Anóxico	m ³	2400
Diámetro del decantador	m	35
Condiciones de operación en el reactor		
Carga másica	kgDBO/kgSSVd	0,17
Tiempo de retención celular	d	12
Tiempo de retención hidráulica	h	18
Sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla	[mg/l]	5234

3.3 Ensayos respirométricos

3.3.1 Preparación de la muestra del licor mezcla

La muestra se preparó con 250 ml del LM de cada reactor y 500 ml de agua potable, previamente tomada y dejada en reposo durante un período no menor a 30 minutos, utilizando una probeta de 1 litro para medir el volumen requerido en cada ensayo. En algunos ensayos se usó un colador con el fin de eliminar flóculos gruesos del licor mezcla, evitando interferencias en las lecturas dadas por los sensores.

Los ensayos se realizaron partiendo de un fango en condiciones endógenas, logrado tras someter el mismo a un período de aireación de 24 horas, debido a que se podrían presentar lecturas equívocas en la tasa de respiración por la porción de materia orgánica que no fue asimilada por los microorganismos. De esta manera, el sustrato residual decrece hasta un nivel insuficiente para que no se produzca crecimiento y solamente sea cubierto el requerimiento energético para el mantenimiento. Este consumo de oxígeno es por mantenimiento, predación y muerte, y se puede considerar constante para una temperatura y una concentración de biomasa activa determinadas.

3.3.2 Instalaciones y equipos

La fase experimental de los ensayos respirométricos se realizaron utilizando los laboratorios del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA), el cual cuenta con un respirómetro tipo BM-Advance Pro de la firma comercial SURCIS S.L.

De acuerdo a la clasificación propuesta por la IWA (figura 1.4, apartado 1.6.1), el respirómetro empleado permite trabajar de forma flexible en función al modo de ensayo a realizar (tabla 1.3) OUR estático y OUR cíclico tipo LSS y R tipo LFS.

El respirómetro BM-Advance Pro posee un reactor de 1 litro de capacidad, un sistema de agitación mediante hélice, un mecanismo de aireación a través de un difusor cerámico de burbuja fina, un sistema termostático, un sistema de bombeo para la recirculación interna del licor mezcla y un sistema para el control de pH (figura 3.2). Este opera en mezcla continua y es controlado térmicamente de forma automática por medio de un sistema *peltier* y calefactor integrado en el propio analizador BM.

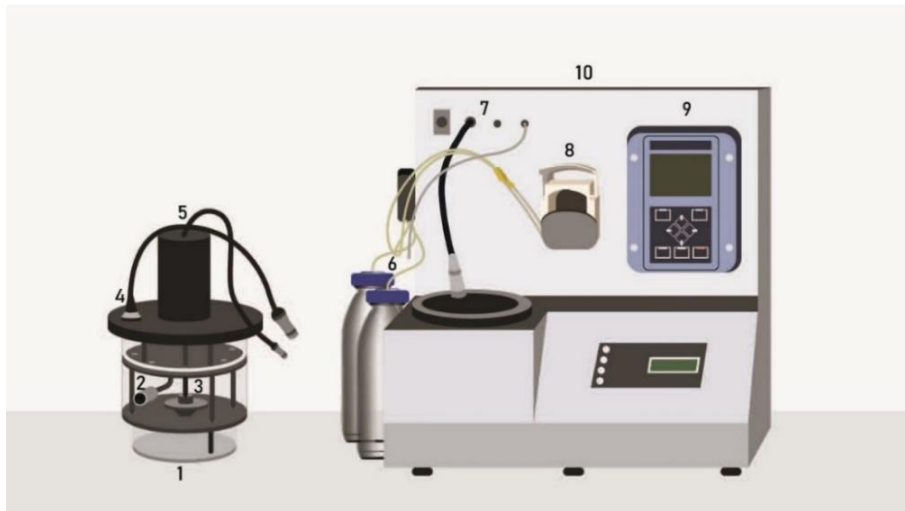


Figura 3.2 Representación esquemática del respirómetro BM-Advance Pro. (1) vaso reactor; (2) difusor de aire; (3) hélice de agitación; (4) sensores; (5) motor de agitación; (6) sistema de bombeo para el control del pH; (7) conectores; (8) bomba peristáltica; (9) panel de control; (10) analizador. Fuente: elaboración propia.

El respirómetro va conectado a una computadora, la cual procesa las señales de los sensores y genera mediante el software integrado al equipo (*BM-Respirometer*) los resultados de tasas de respiración y variables de control. El programa genera automáticamente los datos en formato tabular y gráfico. En la figura 3.3 puede observarse un ejemplo de un ensayo tipo R para la tasa máxima de respiración de bacterias nitrificantes.

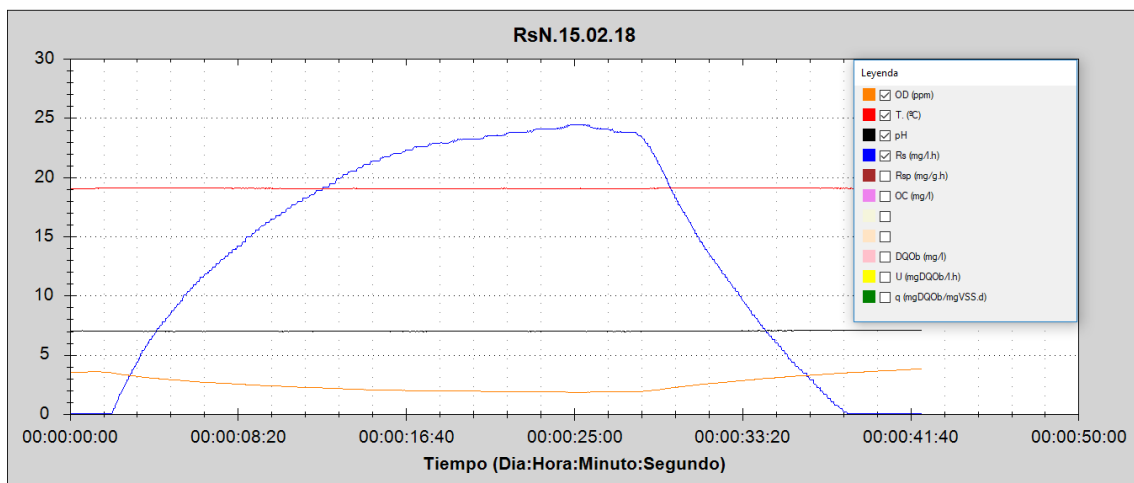


Figura 3.3 Respirograma de la tasa máxima de respiración de bacterias nitrificantes mediante un ensayo R

3.3.3 Protocolo de ensayos respirométricos

Dada la variedad de configuraciones de respirómetros que existen y que son empleados por diferentes autores, no ha sido descrito un protocolo de ensayos para obtener consecutivamente todas las tasas de respiración de las bacterias heterótrofas y autótrofas presentes en el fango activado. La metodología implementada en este estudio para realizar las mediciones respirométricas y cálculos ha sido la descrita por Young & Cowan (2004), la cual ha sido adaptada para los diferentes modos de trabajo del respirómetro BM-Advance Pro.

Los ensayos se llevaron a cabo en las mismas condiciones de temperatura (T^a) y pH de operación en que fue tomada la muestra. Estos valores fueron ajustados de forma automática por el equipo (figura 3.5). La T^a , el pH y el oxígeno disuelto fueron controlados y monitoreados en cada uno de los ensayos, mediante una sonda EasyFerm Plus PHI VP 120 Pt100 (HAMILTON®) y un oxímetro de electrodo tipo Clark. Para esto se realizó un ensayo tipo R, previo a todos los ensayos respirométricos, permitiendo comprobar también el estado endógeno de la biomasa presente en el reactor. Se empleó como disolución tampón hidróxido de sodio (NaOH, 0,1M) y ácido clorhídrico (HCl, 0,1M), adicionados de forma automática por el equipo BM-Advance Pro mediante su bomba peristáltica.

En la figura 3.4 se muestra el esquema de trabajo de los ensayos respirométricos realizados en el presente estudio. Estos fueron realizados secuencialmente empleando la misma muestra de fango del licor mezcla (LM).

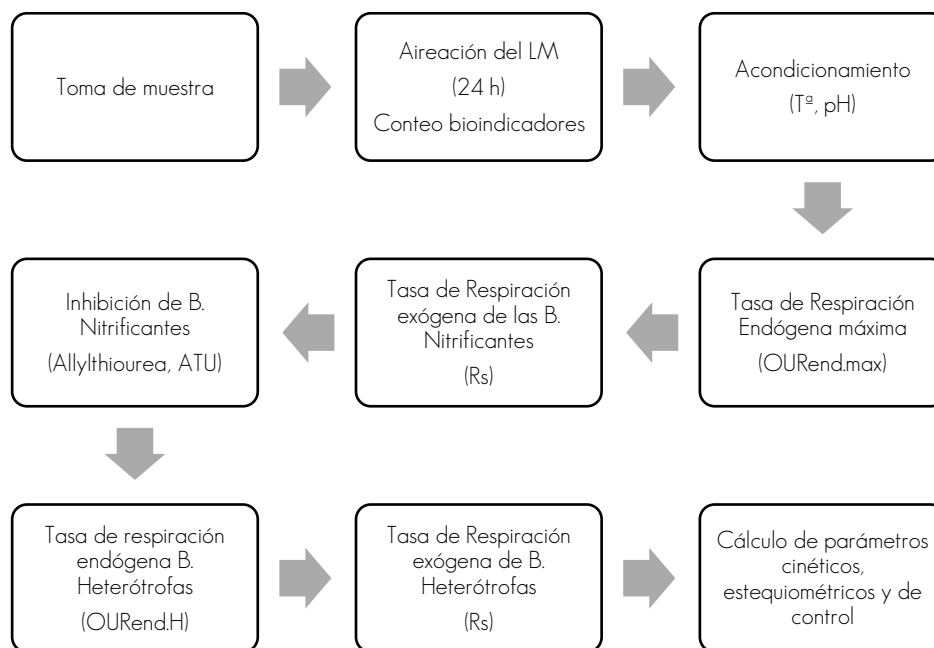


Figura 3.4 Protocolo de trabajo de los ensayos respirométricos

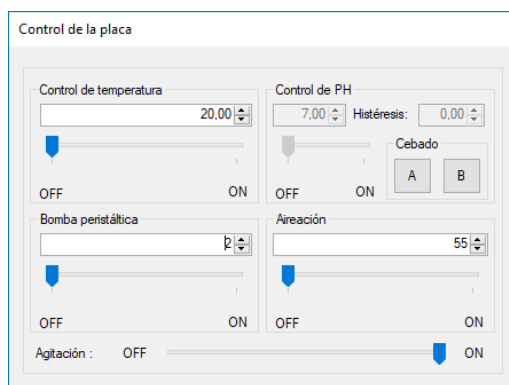


Figura 3.5 Control de placa para calibración de temperatura y pH.

3.3.4 Métodos analíticos

La preparación de las diferentes soluciones empleadas en los ensayos respirométricos requirió del uso de una balanza electrónica de precisión VWR *Science Education* con lectura de 0,001g para pesar cada uno de los reactivos y preparar posteriormente en un matraz aforado de 0,5l el sustrato y en 100 ml la ATU.

Las concentraciones de cada una de las soluciones preparadas para los ensayos, cloruro de amonio (ClNH_4) medido como $[\text{mgN-NH}_4^+/\text{l}]$ y acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) medido como $[\text{mgDQO}/\text{l}]$, fue determinada mediante técnica de espectrofotometría empleando para ello un equipo Spectroquant® NOVA 60 de MERCK. El equipo opera con un método de análisis automático mediante código de barras para las cubetas (test en cubetas) o del auto selector (test en reactivos). Los métodos de análisis se pueden consultar en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Métodos analíticos de espectrofotometría

Método	Test Kit	Referencia	Rango Total	Método
023	DQO	14541	25-1500 mg/l de DQO	Oxidación ácido cromo sulfúrico / determinación como cromo (III)
155	Amonio	100683	2-75 mg/l $\text{NH}_4^+\text{-N}$	Azul Indofenol

3.3.5 Variables respirométricas

Una vez acondicionado el licor mezcla, se efectuaron los ensayos de OUR endógena máxima ($\text{OUR}_{\text{end,max}}$), ingresándose previamente los valores de SSV, pH y T^a para mantener las mismas condiciones durante todo el ensayo. Una vez iniciado el ensayo, el oxígeno disuelto (OD) disminuye a razón de la velocidad en que es consumido por la biomasa para mantenimiento celular. El sensor de OD envía las señales al programa y este calcula la tasa de consumo endógena como la pendiente del OD, según ecuación 3.8, y determina simultáneamente la tasa de consumo específico (SOUR), según ecuación 3.9. Ambos resultados son graficados por el software, tal y como se muestra en la figura 3.6.

$$\text{OUR} = \frac{C_b - C_s}{t} \quad (3.8)$$

Donde C_b : concentración de oxígeno base; C_s : concentración de oxígeno final, t: tiempo desde C_b a C_s .

$$SOUR = \frac{OUR}{SSVLM} \quad (3.9)$$

Donde SSVLM: sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (g/l); SOUR: representa la cantidad de oxígeno consumido por una cierta cantidad de biomasa por unidad de tiempo ($\text{mgO}_2/\text{gSSVLM.h}$)

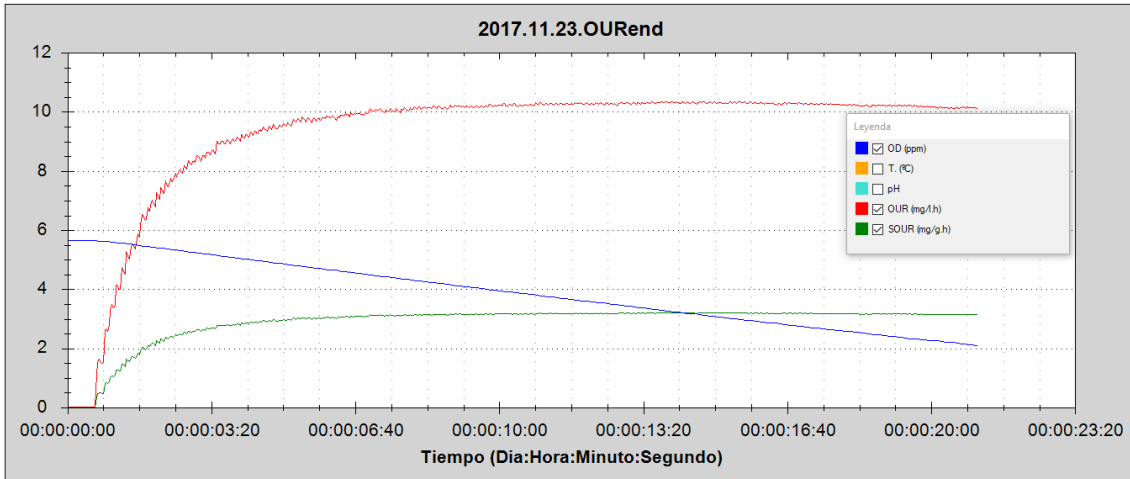


Figura 3.6 Respirograma de tasa de consumo endógeno máximo, OUR y SOUR global.

Para determinar la tasa de respiración endógena de bacterias heterótrofas ($OUR_{\text{end,H}}$) se empleó ATU ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$) como medio inhibidor de las bacterias nitrificantes a una concentración de 10mg/l (Strotmann *et al.*, 1999; Dircks, *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2011). Luego por diferencia entre la $OUR_{\text{end,max}}$ y $OUR_{\text{end,H}}$ se calculó la tasa de respiración endógena de las bacterias nitrificantes ($OUR_{\text{end,N}}$) como se observa en la figura 3.7.

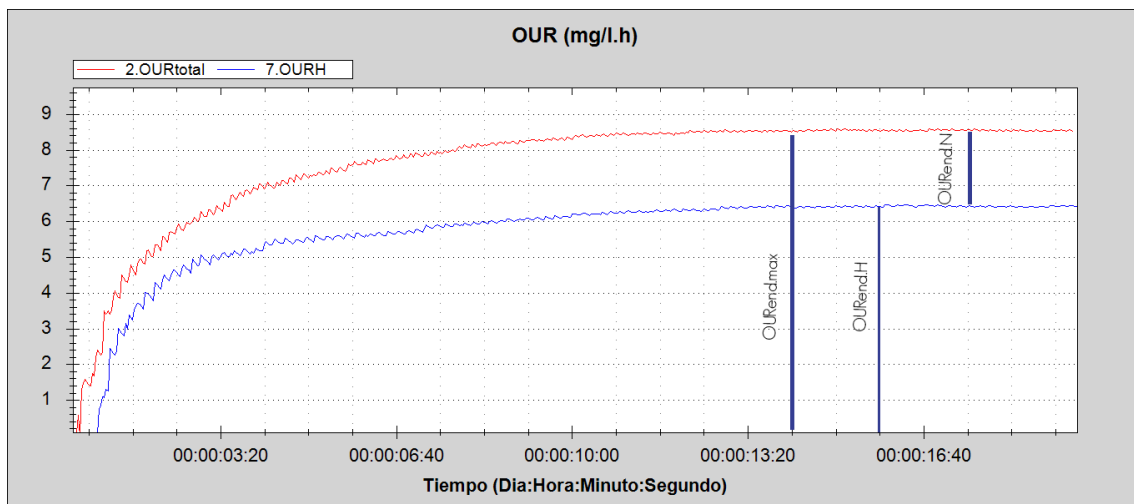


Figura 3.7 Tasa de respiración endógena global, de bacterias heterótrofas y nitrificantes.

El modo de ensayo R permitió medir la tasa máxima de respiración (R_s), el consumo de oxígeno (OC) por crecimiento celular y posteriormente calcular el rendimiento (Y). La tasa de respiración dinámica está en función del diferencial en la concentración del OD fijado en la línea base contra el consumido por crecimiento de la biomasa, tal y como se describe en la ecuación 3.10. Integrando los valores de R_s , se determinó el oxígeno consumido para la oxidación del sustrato añadido (ecuación 3.11).

$$R_s = f_{rs} \cdot f_t \cdot (C_b - C_s) \quad (3.10)$$

Donde R_s : tasa de respiración exógena (mg/l.h); f_{rs} : factor de calibración (valor dependiente del coeficiente específico de transferencia del oxígeno en función de la velocidad de recirculación en el reactor); f_t : factor dinámico (se determina en fábrica y depende del caudal de la bomba y volumen de la zona inferior del vaso reactor); C_b : Línea base (oxígeno inicial que corresponde al estado de respiración endógena (mg/l)); C_s : concentración de oxígeno resultante de la oxidación del sustrato (mg/l).

$$OC = f_d \cdot \int R_s \cdot dt \quad (3.11)$$

Donde, f_d = [factor de dilución] * [extrapolación a unidades de mg/l]

Con el objetivo de conocer posteriormente los parámetros cinéticos y estequiométricos de la biomasa, se llevó a cabo la determinación de la tasa de respiración exógena de las bacterias heterótrofas (R_{sH}) y de las bacterias nitrificantes (R_{sN}). Estas determinaciones se llevaron a cabo mediante un ensayo tipo R, en el que se empleó $CINH_4$ en una relación de 70 mg $CINH_4$ /gSSV en 0,5 litros de agua destilada, y 200mg de $C_2H_3NaO_2$ en 0,5 litros como sustrato para las bacterias nitrificantes y heterótrofas, respectivamente, tomando de estas soluciones 50 ml de muestra para introducir al reactor en el ensayo respectivo.

3.3.6 Parámetros cinéticos y estequiométricos

El propósito de medir las tasas de respiración endógena y exógena de las bacterias presentes en el fango del licor mezcla, es poder determinar posteriormente los parámetros cinéticos y estequiométricos. Estos fueron determinados de acuerdo a la metodología descrita por Young & Cowan (2004), siendo estas las principales variables de interés a relacionar con el proceso de nitrificación. Se ha incluido adicionalmente el cálculo de tasa de decaimiento, rendimiento y concentración de biomasa de bacterias heterótrofas como complemento al estudio. A continuación, se muestran las ecuaciones utilizadas para calcular los diferentes parámetros.

$$\text{Tasa de nitrificación} \quad AUR' = \frac{R_s}{4,57} \quad (3.12)$$

$$\text{Tasa actual de nitrificación} \quad AUR = AUR' \cdot f_{OD} \quad (3.13)$$

$$\text{Tasa de nitrificación máxima} \quad AUR_{max} = \frac{AUR}{f_{OD} \cdot f_{KN}} \quad (3.14)$$

$$\text{Factor de corrección por oxígeno} \quad f_{OD} = \frac{OD}{k_{OD} + OD} \quad (3.15)$$

$$\text{Factor de corrección por sustrato nitrificable} \quad f_{KN} = \frac{S_{NH}}{k_{NH} + S_{NH}} \quad (3.16)$$

$$\text{TRH para el proceso de nitrificación} \quad TRH_N = \frac{V_N}{Q_{afl}} \quad (3.17)$$

V_N : volumen aerobio en el reactor; Q_{afl} : Caudal del afluente

$$\text{Capacidad de nitrificación} \quad C_N = AUR \cdot TRH_N \quad (3.18)$$

$$\text{Tiempo de nitrificación} \quad T_N = \frac{S_{NH}}{AUR} \quad (3.19)$$

$$\text{Rendimiento de bacterias nitrificantes} \quad Y_N = 4,57 - \frac{OC}{S_{NH}} \quad (3.20)$$

$$\text{Concentración de bacterias nitrificantes} \quad X_N = AUR * TRC * Y_N * 24 \quad (3.21)$$

$$\text{Tasa de crecimiento de bacterias nitrificantes} \quad \mu_N = \frac{AUR * Y_N * 24}{X_N} \quad (3.22)$$

$$\text{Tasa de crecimiento máxima de bacterias nitrificantes} \quad \mu_{Nmax} = \frac{AUR_{max} * Y_N * 24}{X_N} \quad (3.23)$$

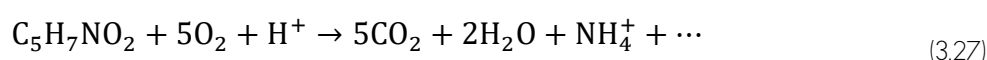
$$\text{Edad de fango mínima para nitrificación} \quad TRC_{min} = \frac{1}{\mu_{N,max}} \quad (3.24)$$

$$\text{Rendimiento de bacterias heterótrofas} \quad Y_H = 1 - \frac{OC}{DQO} \quad (3.25)$$

$$\text{Concentración de bacterias heterótrofas} \quad X_H = \frac{OUR_{endH} * 24}{b_H * f_{cv}} \quad (3.26)$$

El valor de la constante de semisaturación de oxígeno (K_{OD}) utilizado fue el reportado por Henze M (1995) y Rittmann & McCarty (2001), con un valor de 0,5 mgO₂/l. Por otro lado, la constante de semisaturación de nitrógeno (K_N) fue tomado como valor bibliográfico, el propuesto por Dold & Marais (1986), Bidstrup & Grady (1988) y EPA (1993), quienes reportaron un valor de 1,0 mg N-NH₄⁺/l.

Asumiendo la fórmula empírica de la composición de la biomasa como C₅H₇NO₂ (EPA, 1993), a quien le corresponde un peso molecular de 113 mg/mmol, se calculó a partir de la ecuación 3.27 la DQO requerida para oxidar la célula de una bacteria, cuya relación se expresa como f_{cv} con un valor de 1,42 mgDQO/mgSSV (Daigger & Grady, 1998). Por otro lado, los mg de O₂ necesarios estequiométricamente para la oxidación de cada mg de N-NH₄⁺ son 4,57 (Jubany *et al.*, 2008).



$$f_{cv} = \frac{X}{SSV_{micr.}} = \frac{160}{113} = 1,42 \frac{mgDQO}{mgSSV} \quad (3.28)$$

La tasa de decaimiento de bacterias nitrificantes fue calculada según ecuación 3.29, propuesta por Melcer (2004), similar a los valores reportados por Salem *et al.* (2006). Mientras que para bacterias heterótrofas fue utilizada la ecuación de Ekama *et al.* (1986).

$$b_N = 0,17 * 1,029^{(T-20)} \quad (3.29)$$

$$b_H = 0,24 * 1,04^{(T-20)} \quad (3.30)$$

El rendimiento de las bacterias nitrificantes ha sido estudiado mediante técnica respirométrica por Guisasola (2005), Jubany (2007) y Liu & Wang (2012), encontrando valores de 0,29, 0,26 y 0,34 gDQO/gN, respectivamente, expresado como cantidad de biomasa autótrofa producida por unidad de nitrato producido. Para el estudio se ha tomado

el valor obtenido por Jubany (2007), el cual es similar al reportado por Henze (1995) (0,24 gDQO/gN) e implementado en el modelo ASM2 como valor típico en diseño y simulación de EDAR.

La fracción de bacterias nitrificantes fue obtenida de acuerdo al resultado experimental obtenido por Carrera *et al.* (2004), según ecuación 3.31.

$$F_N = 0,0265 + 0,508e^{\left(-2,39\left(\frac{DBO5}{NKT}\right)\right)} + 0,21e^{\left(-0,43\left(\frac{DBO5}{NKT}\right)\right)} \quad (3.31)$$

3.4 Variables biológicas

En una estación depuradora de fangos activos es imprescindible realizar un análisis del fango por medio de la observación microscópica. Esto permite deducir las condiciones actuales, si se encuentran en equilibrio o si existe algún tipo de disfunción (Salvadó, 1995).

La identificación y cuantificación de los diferentes microorganismos (protozoos y metazoos) presentes en el licor mezcla se realizó a partir de observación en vivo mediante microscopía óptica, empleando un microscopio Zeiss, modelo Axiostar, utilizando tanto la iluminación de campo claro como el contraste de fases. Las observaciones se realizaron en un intervalo de tiempo máximo de 24 horas, en el cual no se producen cambios significativos en la estructura de la población de protistas (Abraham *et al.*, 1997).

El licor mezcla se agitó suavemente para homogeneizar totalmente la muestra. Se tomó dos alícuotas de 25 µl del LM (Madoni, 1988) y se depositó sobre un portaobjetos, luego se cubrió con un cubreobjetos de 18 x 18 mm de superficie. Además, se utilizaron cuatro réplicas adicionales para el recuento de ciliados sésiles coloniales, según recomiendan Dubber & Gray (2009). Las abundancias de organismos del licor mezcla se dan en individuos por mililitro (ind/ml).

El recuento se realizó partiendo de un extremo del cubreobjetos, desplazándose en una misma dirección, por ejemplo, verticalmente, hasta llegar al extremo opuesto. Una vez en el nuevo extremo se desplaza hacia la derecha, hasta que aparece un nuevo campo visual que no se solapa con el anterior, y posteriormente se desplaza de nuevo la muestra en la misma dirección vertical (figura 3.8).

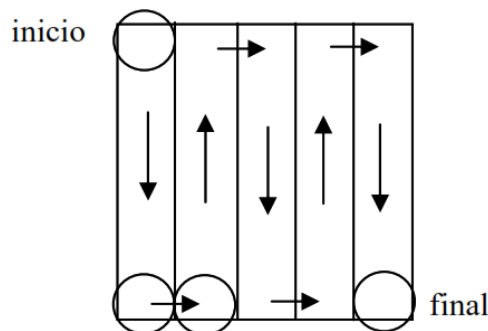


Figura 3.8 Procedimiento para el recuento de protistas y metazoos en el microscopio. Fuente (Vasco, 2009)

3.5 Análisis estadísticos

Se han analizado un total de 22 muestras durante el período de noviembre 2017 a junio 2018, los cuales tienen asociados valores de variables operacionales y fisicoquímicas correspondientes a cada una de estas. La Tabla 3.3 contiene las fechas correspondientes a cada muestra.

Tabla 3.3 Número de muestras y fechas procedentes

Muestra	Fecha	Muestra	Fecha
ML1	15.11.2017	ML12	20.02.2018
ML2	22.11.2017	ML13	27.02.2018
ML3	29.11.2017	ML14	06.03.2018
ML4	14.12.2017	ML15	20.03.2018
ML5	22.12.2017	ML16	11.04.2018
ML6	12.01.2018	ML17	16.04.2018
ML7	19.01.2018	ML18	23.04.2018
ML8	25.01.2018	ML19	02.05.2018
ML9	30.01.2018	ML20	08.05.2018
ML10	06.02.2018	ML21	15.05.2018
ML11	13.02.2018	ML22	12.06.2018

Para el análisis estadístico se tienen tres conjuntos de variables: las variables ambientales (denominadas explicativas o independientes), las variables biológicas (denominadas respuesta o dependientes) y variables respirométricas (tanto explicativas como de respuesta). Las variables biológicas representan los distintos taxones de protistas y metazoos, mientras que las ambientales engloban las variables operacionales y fisicoquímicas de las EDAR. En el caso de las variables respirométricas, comprenden tasas de consumo de oxígeno, parámetros estequiométricos y cinéticos.

La estrategia general seguida para el tratamiento de los datos ha sido en primer lugar el análisis descriptivo y tratamiento preliminar de los conjuntos de variables: ambientales (variables fisicoquímicas y operacionales), respirométricas (tasas de consumo y estequiométricos), y biológicas (protistas y metazoos).

Algunas de las herramientas clásicas de estadística descriptiva aplicadas al conjunto de datos han sido: media, mediana, desviación estándar, rango (mínimo-máximo) y una prueba de valores atípicos (*outliers*). Adicionalmente, se han empleado diagramas de cajas y bigotes, los cuales permiten visualizar la dispersión y simetría de los datos a escala mensual, representando los tres cuartiles, la mediana, el valor mínimo y máximo de los datos, así como los valores anómalos. Obsérvese en la tabla 3.3 que la composición de cada caja mensualmente varía en función al número de muestras, distribuyendo las 22 muestras en noviembre, n=3; diciembre, n=2; enero, n=4, febrero, n=4, marzo, n=2, abril, n=3, mayo, n=3; junio, n=1.

Se realizó un análisis preliminar bivalente (exploratorio) con el fin de establecer vínculos entre los resultados respirométricos y los parámetros fisicoquímicos, operacionales y biológicos. Este

análisis consistió en el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson siendo referente a correlaciones paramétricas. Además, se utilizó un análisis clúster como análisis exploratorio para determinar las agrupaciones de las muestras.

Existen métodos de análisis multivariante que permiten ordenar y clasificar un conjunto grande de datos para visualizar los patrones de distribución entre estos y comprender las relaciones entre las variables analizadas. Por ello, se realizó un análisis exploratorio de ambos conjuntos de variables, empleando técnicas multivariantes con un enfoque no paramétrico y basadas en matrices de distancia, a través del escalonamiento multidimensional no métrico (nMDS) y análisis de similitudes (ANOSIM), así como el análisis clúster. Por último, el análisis de interpretación ambiental permite relacionar ambos conjuntos de variables (explicativas y respuesta) a partir de modelos lineales basados en la distancia (DISTLM). Los modelos construidos han sido visualizados a través del análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA).

Los datos biológicos (protistas y metazoos) se transformaron logarítmicamente [$\log(\text{variable} + 1)$] para dar mayor peso a las especies que tienen bajas tasas de crecimiento. Por otro lado, las variables ambientales fueron transformadas logarítmicamente para su normalización, y estandarizadas para homogenizar las diferentes escalas de medida. Previamente a los análisis exploratorios y de interpretación ambiental, fueron construidas las matrices de similitud (matrices distancia) de las variables biológicas transformadas, utilizando el índice de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957), así como las correspondientes a las variables ambientales transformadas y estandarizadas, utilizando la distancia euclídea.

Se ha empleado el software Minitab 18 para el cálculo de los estadísticos descriptivos, el análisis bivariado de correlaciones de Pearson y el modelo de predicción para el rNKTs. Todos los métodos utilizados correspondientes al análisis exploratorio y de interpretación ambiental han sido realizados con PRIMER v7 (Clarke & Gorley, 2015) y PERMANOVA+ para PRIMER (Anderson *et al.*, 2008). Los diferentes tipos de análisis que se han considerado en la relación de las variables se describen a continuación.

3.5.1 Prueba de valores atípicos (outliers)

Un *outlier* puede definirse como una observación o conjunto de observaciones que parecen ser inconsistentes con el resto del conjunto de datos (Barnett & Lewis, 1984). Hawkins, (1980) presenta una definición similar, al definir un *outlier* como “una observación que se desvía mucho de otras observaciones y despierta sospechas de ser generada por un mecanismo diferente”. Beckamn & Cook (1983), se refieren a los *outliers* ya sea como observaciones discordantes o como contaminantes. Una observación discordante es cualquier observación sorpresiva o discrepante para el investigador. Un contaminante es cualquier observación que no hace parte de la distribución objetivo.

Se hace necesario conocer si existen *outliers* dentro de los diferentes grupos de variables, pues según Chandola *et al.* (2007) los datos extremos se convierten en ruido al no ser de interés para el analista y actúan como un obstáculo para el análisis de los datos. Para detectar *outliers* en el conjunto de variables se ha empleado el método de Grubbs. Con la detección de estos valores atípicos se puede realizar una mejor interpretación sobre los resultados,

permitiendo luego aplicar correctamente un análisis de correlación (p. ej. de Pearson) sin que exista una diferencia significativa en el coeficiente obtenido.

La prueba de Grubbs se utiliza para detectar valores atípicos en un conjunto de datos univariante y se basa en el supuesto de normalidad. El estadístico de la prueba de Grubbs (G) es la diferencia entre la media de la muestra y el valor de los datos más grande o más pequeño, dividida entre la desviación estándar. Se utiliza el estadístico de la prueba de Grubbs para calcular el valor p, que es la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera.

$$G = \text{máx}, \left\{ \frac{\bar{x} - x_1}{s}, \frac{x_n - \bar{x}}{s} \right\} \quad (3.32)$$

Donde \bar{x} : la media de la muestra; x_1 : el valor más pequeño en la muestra; s : la desviación estándar de la muestra; x_n : el número más grande de la muestra

La prueba de hipótesis utiliza los datos de la muestra para determinar si se puede rechazar la hipótesis nula. La hipótesis nula (H_0) indica que todos los valores de los datos provienen de la misma distribución normal, y la hipótesis alternativa indica que el valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico. El nivel de significancia (denotado como α o alfa) es el máximo nivel de error aceptable de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es verdadera (error tipo 1 en estadística), se ha considerado un $\alpha = 0,05$ el cual indica un error de 5% de concluir que existe una diferencia cuando no hay una diferencia real.

El valor p es una probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula. Un valor p más pequeño proporciona una evidencia más fuerte en contra de la hipótesis nula. Para un valor $p \leq \alpha$: existe un valor atípico, y por tanto se rechaza H_0 ; si el valor p es menor que o igual al nivel de significancia, la decisión es no aceptar la hipótesis nula y concluir que existe evidencia estadística para rechazar H_0 . Para un valor $p > \alpha$: no se puede concluir que existe un valor atípico, y por tanto no se puede rechazar H_0 . Si el valor p es mayor que el nivel de significancia, la decisión es que no se puede rechazar la hipótesis nula, porque no se cuenta con suficiente evidencia para concluir que existe un valor atípico.

3.5.2 Análisis clúster

El análisis clúster es una técnica multivariante cuyo objetivo es clasificar objetos formando grupos/conglomerados (clúster) que sean lo más homogéneos posible dentro de sí mismos y heterogéneos entre sí. Con el fin de revelar categorías bien definidas de objetos, y, por lo tanto, reducir la dimensionalidad del conjunto de datos a unos pocos grupos de filas (James & McCulloch, 1990).

Se trata, fundamentalmente, de resolver el siguiente problema: Dado un conjunto de individuos (de N elementos) caracterizados por la información de n variables $\{X_j\}_{j=1,2,\dots,n}$, se plantea el reto de ser capaz de clasificar de manera que los individuos pertenecientes a un grupo (clúster) (y siempre con respecto a la información disponible) sean tan similares entre sí como sea posible, siendo los distintos grupos entre ellos tan disimilares como sea posible (Ríos, 2017).

El análisis clúster de un conjunto de datos se realiza en dos pasos (Ramette, 2007). En primer lugar, se elige un coeficiente (similitud o disimilitud) para medir la asociación entre objetos o entre variables (ambientales o biológicas). En segundo lugar, la matriz distancia de asociación calculada se representa en forma de árbol horizontal o como grupos distintos de objetos.

En exploración de relaciones entre objetos asociados a variables ambientales (variables operacionales y variables fisicoquímicas en las EDAR) es aconsejable utilizar la distancia euclídea, mientras que en el caso de las variables biológicas (protistas y metazoos) es más apropiada la distancia de Bray-Curtis (Clarke *et al.*, 2014).

3.5.3 Coeficiente de correlación de Pearson

El coeficiente de correlación de Pearson, también conocido como coeficiente de correlación "r", es el más ampliamente utilizado en investigación como una forma de resumir el alcance de la relación entre dos variables. El r de Pearson mide la fuerza de la asociación lineal entre dos variables.

Si las dos variables tienen una relación lineal en la dirección positiva, entonces r será positiva y considerablemente superior a 0. Si la relación lineal está en la dirección negativa, de modo que aumenta en una variable mientras que la otra disminuye, entonces $r < 0$. Los valores posibles de r varían de -1 a +1, con valores cercanos a 0 que significan poca relación entre las dos variables (Wicks, 1998). Según Cohen (1988), un valor absoluto de r de 0,1 se clasifica como pequeño, un valor absoluto de 0,3 se clasifica como medio y de 0,5 se clasifica como grande. Mediante el coeficiente de correlación de Pearson se determinó la colinealidad entre las variables, cuando el coeficiente fue superior a 0,85 se eliminó una de las dos variables para la construcción de los modelos de regresión lineal múltiple multivariante.

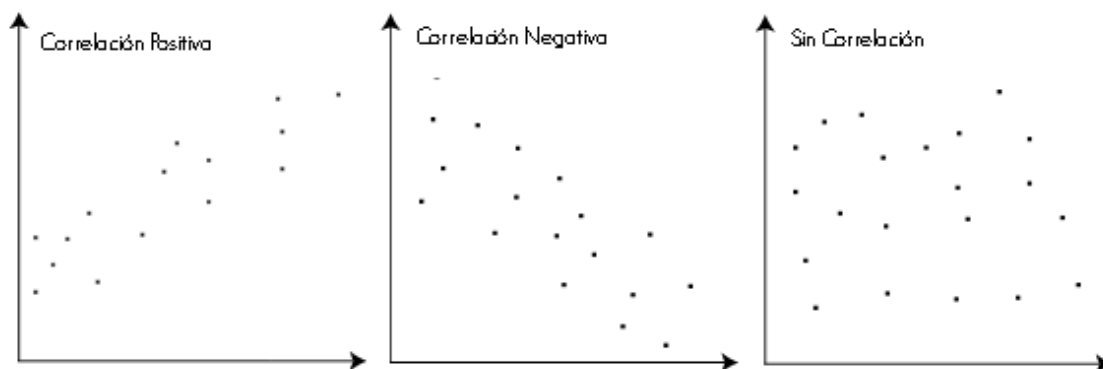


Figura 3.9 Tipos de correlación. Fuente: statstutor.ac.uk

3.5.4 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) es una técnica estadística multivariante de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos de muchas variables, lo que hace el método es disminuir el máximo número de variables posibles. De forma que, se logre explicar la mayor cantidad de varianza de los datos, denominadas originales, en un nuevo conjunto de variables (componentes principales). Para ello, se evita perder la menor cantidad de información posible (Herve & Lynne, 2010), con el objetivo de explicar la mayor cantidad de varianza de los datos originales (Hotelling, 1933).

Las componentes principales se caracterizan por estar incorrelacionadas entre sí y, además, pueden ordenarse de acuerdo con la información que llevan incorporada. Como medida de la cantidad de información incorporada en una componente se utiliza su varianza. Es decir, cuanto mayor sea su varianza mayor es la cantidad de información que lleva incorporada dicha componente. Por esta razón se selecciona como primera componente aquella que tenga mayor varianza explicada, mientras que la última componente es la de menor varianza explicada. El objetivo es representar los objetos (filas) y variables (columnas) del conjunto de datos en un nuevo sistema de coordenadas (generalmente en dos o tres ejes o dimensiones) donde puede ser representada la mayor cantidad de la variación del conjunto de los datos originales.

3.5.5 Escalonamiento multidimensional no métrico

El escalonamiento multidimensional no métrico (nMDS, *non-metric multidimensional scaling*) es una técnica exploratoria multivariante de interdependencia que trata de representar en un espacio geométrico de pocas dimensiones las proximidades existentes entre un conjunto de objetos. El nMDS es un método de ordenación basado en la distancia entre pares de variables (matriz distancia), no siendo necesario el supuesto de normalidad multivariante del conjunto de datos. Emplea una regresión monótona de mínimos cuadrados y se aplica normalmente donde intervienen datos de preferencia y juicios de apreciación humana muy probablemente sujetos a error (López & Hidalgo, 2010).

El nMDS es una técnica de ordenación que difiere en varios aspectos de casi todos los demás métodos de ordenación. En la mayoría de los métodos, se calculan muchos ejes, pero solo se ven unos pocos, debido a limitaciones gráficas. En el nMDS, una pequeña cantidad de ejes se eligen explícitamente antes del análisis y los datos se ajustan a esas dimensiones; no hay ejes ocultos de variación, en la figura 3.10 puede verse un ejemplo y su interpretación. En segundo lugar, la mayoría de los demás métodos de ordenación son analíticos y, por lo tanto, dan como resultado una única solución para un conjunto de datos. Por el contrario, el nMDS es una técnica numérica que busca de forma iterativa una solución y detiene el cálculo cuando se ha encontrado una solución aceptable, o se detiene después de un número predeterminado de intentos. Como resultado, una ordenación nMDS no es una solución única y un posterior análisis del nMDS en el mismo conjunto de datos y siguiendo la misma metodología probablemente resultará en una ordenación algo diferente. En tercer lugar, nMDS no es una técnica de valor propio-autovector, como el análisis de componentes principales o el análisis de correspondencia que ordena los datos de forma que el eje 1 explique la mayor cantidad de varianza, el eje 2 explique la siguiente cantidad más grande de varianza, y así sucesivamente. Como resultado, una ordenación de nMDS puede girarse, invertirse o centrarse en cualquier configuración deseada (Holland, 2008).

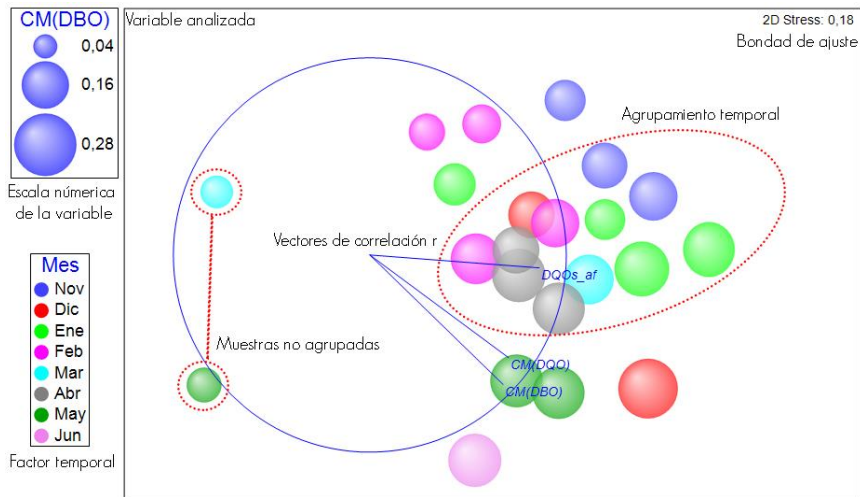


Figura 3.10 Interpretación de un gráfico nMDS

3.5.6 Análisis de similitudes

El análisis de similitudes (ANOSIM) es un procedimiento no paramétrico que proporciona una forma de evaluar estadísticamente si existe una diferencia significativa entre dos o más grupos de unidades de muestreo; este opera directamente en una matriz de diferencias. La rutina ANOSIM es muy útil cuando se emplea de forma complementaria con el nMDS, detectando si existen diferencias significativas y valorando la distancia (estadístico R) a partir de los factores definidos.

Compara los rangos de distancias entre grupos con rangos de distancias dentro de los grupos. Se comparan las medias de ambos tipos de rangos, y la resultante del test estadístico R mide si existe una separación entre grupos ($R=1$) o no ($R=0$). Valores de $R>0,75$ se interpretan como buena separación, $R>0,5$ como separados (pero superpuestos) y $R<0,25$ como apenas separados (Clarke *et al.*, 2014).

3.5.7 Análisis de redundancia basado en la distancia

Para relacionar las variables biológicas y contrastarlas con la variabilidad generada por las variables ambientales son empleados modelos lineales basados en la distancia (DISTLM, *distance-based linear models*). Uno de estos enfoques es el análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA, *distance-based redundancy analysis*), utilizado para realizar una ordenación de los valores ajustados de un modelo dado. Los ejes dbRDA describen el porcentaje de la variación ajustada o total explicada por cada eje.

El análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA) es un método para llevar a cabo ordenaciones restringidas en datos utilizando medidas de distancia no euclidianas. Los métodos habituales para ordenaciones restringidas (CCA, RDA) utilizan la distancia euclidiana, pero se ha descubierto que esta medida de distancia es inapropiada para algunos tipos de datos (Clarke *et al.*, 2014). El dbRDA elude este problema usando un proceso de tres pasos: primero, se calcula una matriz de distancia usando la medida de distancia de elección. A continuación, se realiza un análisis de coordenadas principales (PCoA) en la matriz. Finalmente, los valores propios obtenidos en el PCoA se conectan a un análisis de redundancia (RDA). La función "capscale" se utiliza para llevar a cabo análisis de redundancia basados en distancia. El procedimiento le proporciona un valor pseudo-F, que es una medida

de la importancia del análisis general. También hay opciones para saber cuánta variación representa cada eje, así como para descubrir qué variables explicativas y qué ejes son significativos. Existe un limitante que se debe tener en cuenta con el dbRDA (y las RDA en general), este asume que las variables dependientes responden de forma lineal a los cambios en las variables de predicción (Hamann, 2016).

McArdle & Anderson (2001) perfeccionaron la rutina proporcionando un enfoque más directo, siendo el método implementado en el DISTLM y descrito de forma detallada por Anderson *et al.* (2008). Este nuevo enfoque no requiere el cálculo de los ejes del PCoA, ni ciertas correcciones sobre la presencia de valores propios negativos. La rutina DISTLM se utiliza para realizar particiones, probar hipótesis y construir modelos, mientras que la rutina dbRDA se utiliza para realizar una ordenación de los valores ajustados de un modelo dado. En la rutina dbRDA, la estructura de la nube de puntos se visualiza a través del modelo haciendo un análisis propio (*eigenanalysis*) ajustado de dicha nube. Mientras que en el PCoA la matriz distancia original es una ordenación sin restricciones (puesto que se examina la matriz distancia sola, libre de cualquier modelo o hipótesis específica), el dbRDA está limitado a encontrar combinaciones lineales de las variables independientes que explican la mayor variación en la nube de puntos.

DISTLM es una rutina que permite analizar y modelizar la relación entre una nube de puntos de carácter multivariante, descrito por una matriz de semejanza y una o más variables explicativas. La rutina permite que las variables explicativas se ajusten de forma individual o conjunta en grupos específicos. El valor-P, utilizado para probar la hipótesis nula de ausencia de relación, se obtiene utilizando métodos apropiados de permutación. La rutina DISTLM no sólo proporciona medidas cuantitativas y pruebas de la variación explicada por una o más variables explicativas, sino que dispone de un conjunto de nuevas herramientas para la construcción de modelos y la generación de hipótesis. Con DISTLM pueden construirse modelos parsimoniosos utilizando diferentes criterios y procedimientos de selección del modelo. Previo a la exploración de modelos es imprescindible evaluar la multicolinealidad entre las variables explicativas, excluyendo del modelo aquellas variables con elevados coeficientes de correlación ($>0,85$), aunque la decisión final de exclusión puede variar en función de los objetivos planteados (Anderson *et al.*, 2008). Por último, una vez construido un modelo determinado, este puede ser visualizado en el espacio multidimensional utilizando la rutina dbRDA. Previamente a la aplicación de la rutina DISTLM, se utilizó la matriz de correlación de Pearson entre pares de variables ambientales con el fin de examinar la colinealidad, eliminando aquellas variables que presentaron coeficientes de correlación mayores de 0,85 (Anderson *et al.*, 2008).

Considere una matriz ($N \times p$) de las variables de respuesta Y , donde N es el número de muestras y p es el número de variables. Considere también una matriz ($N \times q$), X que contiene q variables explicativas (predictoras) de interés (por ejemplo, variables ambientales). El propósito de DISTLM es realizar una prueba de permutación para la hipótesis nula multivariante de no relación entre las matrices Y y X sobre la base de una medida de semejanza elegida, usando permutaciones de las muestras para obtener un valor P . En esencia, el propósito aquí es hacer la pregunta: ¿ X explica una proporción significativa de la variación multivariada en la nube de datos descrita por la matriz de semejanzas obtenida de Y ? Tenga en cuenta que el análisis realizado por DISTLM es direccional y que estos conjuntos

de variables tienen roles particulares. Las variables en X se utilizan para explicar, modelar o predecir la variabilidad en la nube de datos descrita por la matriz de semejanza que surge de Y (Anderson *et al.*, 2008).

Para evaluar la contribución de las variables respirométricas en la variabilidad observada en la abundancia de especies de protistas y metazoos, y las variables respirométricas y la variabilidad observada en la calidad del efluente en los componentes de nitrógeno, la estrategia empleada ha sido la construcción de modelos a partir de criterios y procedimientos parsimoniosos (*step-wise/AIC, An Information Criterion*). Por otro lado, para evaluar la contribución de las variables ambientales en la variabilidad observada en las variables respirométricas, la estrategia empleada para la construcción del modelo ha sido el criterio BIC (*Bayesian Information Criterion*). A partir de estos criterios y procedimientos se analizaron individualmente (*test marginal*), ignorando el resto de variables, y secuencialmente (*test secuencial*) las variables explicativas de cada modelo.

En la tabla 3.4, se muestra a modo de ejemplo, el resultado general del DISTLM. Este genera 4 ejes que explican la variación de los componentes de nitrógeno en el efluente de acuerdo a las variables explicativas. Para los análisis se han seleccionado siempre los dos primeros ejes, pues son los que tienen un mayor porcentaje de explicación. Por otro lado, en la tabla 3.5 se muestran las correlaciones parciales múltiples entre los ejes de coordenadas dbRDA y las variables explicativas (se seleccionaron para el análisis las que tuvieron mayor correlación con los ejes) y, los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables respuesta y cada uno de los ejes de dbRDA.

Tabla 3.4 Porcentaje de variación explicado por ejes individuales del modelo DISTLM

Eje	Variación explicada del modelo ajustado		Variación explicada de la variación total	
	Individual	Acumulada	Individual	Acumulada
1	47,67	47,67	18,15	18,15
2	30,30	77,97	11,54	29,69
3	21,62	99,59	8,23	37,92
4	0,41	100	0,16	38,08

Tabla 3.5 Interpretación de los resultados del DistLM

	Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4	Ejes de coordenadas
Variables explicativas seleccionadas por el modelo entre todas las variables respirométricas de acuerdo a la mejor solución según criterio de selección	μNmax	0,90	-0,03	0,44	0,02	Relaciones entre los ejes de coordenadas dbRDA y las variables explicativas
	OURend.H	-0,41	-0,26	0,83	-0,27	
	TRC _N	0,06	0,61	-0,04	-0,79	
	TRH _N	-0,15	0,74	0,34	0,55	
Variables de respuesta	NT _s	-0,61	-0,05	-0,14	0,00	Coeficientes de correlación con los ejes individuales de dbRDA
	N-NH ₄ ⁺	-0,35	-0,40	0,36	0,07	
	N-NO ₂ ⁻	0,32	-0,45	-0,34	0,05	
	N-NO ₃ ⁻	-0,20	0,28	-0,44	0,04	
	NKT _s	-0,51	-0,29	0,02	-0,02	
	rNKT _s	0,48	0,28	0,02	0,04	
rNT _s	0,39	-0,04	0,39	0,01		

IV.RESULTADOS

4 RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados obtenidos del estudio del proceso de nitrificación de la EDAR de Molina de Segura entre las variables respirométricas y su relación con bioindicadores y variables del proceso. Los resultados han sido presentados en forma esquemática según las variables estudiadas, incluyendo al final del apartado los modelos lineales del análisis de interpretación ambiental y de predicción.

4.1 Relación entre las variables fisicoquímicas sobre el proceso de nitrificación

Durante el período de noviembre de 2017 a junio de 2018 se evaluaron con una frecuencia semanal 7 variables fisicoquímicas del afluente al reactor y del licor mezcla (T^a , pH, SSV, DQO, DBO, NKTs y $N-NH_4^+$), y 7 del efluente relacionadas con el nitrógeno, incluyendo variables fisicoquímicas (NTs , $NKTs$, $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$) y variables relacionadas con el rendimiento del proceso de nitrificación ($rNTs$ y $rNKTs$), en el anexo 2 puede consultarse la matriz completa.

De forma preliminar se realizó el cálculo de estadísticos descriptivos del conjunto de variables que se presentan en las tablas 4.1 y 4.3. Encontrando que las variables con mayor desviación relativa respecto a su media han sido el $N-NH_4^+$ del afluente al reactor y la DBO en el licor mezcla (LM), con un valor de 28% para ambos casos. Adicionalmente, con la prueba de valores atípicos de Grubbs (ver ítem 3.6.1) se encontró que la muestra ML4 reportó un valor inusual para la variable $N-NO_2^-$, cuyo valor corresponde al valor máximo del conjunto de muestras. El anexo 3 contiene la matriz completa de las variables de nitrógeno efluente.

Los valores encontrados en la EDAR Molina del Segura, a excepción de los rendimientos, presentan diferencias significativas en comparación con otras plantas de fangos activados con eliminación de nitrógeno estudiadas por Zornoza (2017) como Quart Benàger (QB), Denia-Ondara-Pedreguer (DP) y Carraixet (CX), y los valores típicos de aguas residuales urbanas reportados por Tchobanoglous & Burton (2003), tal y como se muestran en las tablas 4.2 y 4.4. Los valores comparativos están expresados como la media más/menos la desviación estándar y los valores típicos están dados de acuerdo al rango.

Tabla 4.1 Resumen estadístico de las variables fisicoquímicas del licor mezcla y afluente al reactor

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	p
T^a	22	21,0	2,4	17,3	25,8	2,0	0,800
pH	22	7,2	0,1	7,0	7,5	2,7	0,083
SSV	22	5234	860	4274	7258	2,4	0,265
DQO	22	965,5	183,8	473,0	1143,0	2,7	0,072
DBO	22	663,4	188,7	256,0	900,0	2,2	0,507
NKTs	22	56,3	8,8	42,5	73,0	1,9	1,000
N-NH₄⁺	22	43,3	12,1	27,6	66,9	1,9	0,929
CN-NH₄⁺	22	10,86	3,70	4,99	17,73	1,9	1,000
CP-PO₄	22	1,63	0,49	0,37	2,53	2,6	0,120

G: estadístico de Grubbs; p: probabilístico de Grubbs

Tabla 4.2 Comparación de parámetros fisicoquímicos afluente al reactor y valores típicos de agua residual doméstica.

Variable	QB	DP	CX	Tchobanoglous, <i>et al.</i> , 2003
Tª	21,3 ± 3,7	18,5 ± 4,2	20,2 ± 3,5	10-21
pH	7,44 ± 0,18	7,40 ± 0,26	7,44 ± 0,20	7,5-8,6
SSV	1947 ± 305	2239 ± 230	1605 ± 436	80-275
DQO	418 ± 162	312 ± 157	332 ± 174	250-1000
DBO	244 ± 111	159 ± 64	141 ± 48	110-440
NKTs	45 ± 16	40 ± 13	-	20-85
N-NH ₄ ⁺	40 ± 12	27 ± 13	25,7 ± 7,5	12-50
CN-NH ₄ ⁺	37 ± 14	19,7 ± 8,2	63 ± 23	-
CP-PO ₄	2,3 ± 1,3	2,2 ± 1,3	11,4 ± 4,8	-

EDAR: Quart Benàger (QB), Denia-Ondara-Pedreguer (DP) y Carraixet (CX), Zornoza (2017).

Tabla 4.3 Resumen estadístico de las variables fisicoquímicas efluente y rendimientos

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	p
NTs	22	9,55	2,60	2,60	13,60	2,67	0,074
N-NH ₄ ⁺	22	2,95	2,84	0,16	10,60	2,69	0,067
N-NO ₂ ⁻	22	0,66	0,65	0,04	2,53	2,87	0,028
N-NO ₃ ⁻	22	4,34	2,32	0,96	8,84	1,94	0,971
NKTs	22	4,33	2,09	1,02	8,80	2,14	0,543
rNKTs	22	92,45	3,05	85,90	98,31	2,15	0,520
rNTs	22	83,07	5,15	72,91	95,69	2,45	0,183

Tabla 4.4 Comparación de la calidad del efluente para nitrógeno con otras plantas. Zornoza (2017)

Variable	QB	DP	CX
NTs	18,7 ± 11,3	6,4 ± 1,6	-
N-NH ₄ ⁺	9,2 ± 9,7	0,2 ± 0,3	4,4 ± 6,3
N-NO ₂ ⁻	0,1 ± 0,1	11 ± 10	-
N-NO ₃ ⁻	3,9 ± 1,7	6,2 ± 2,6	11,6 ± 3,4
NKTs	2,4 ± 1,1	11 ± 10	-
rNKTs	78 ± 17	93,4 ± 3,5	-
rNTs	61 ± 15	82,9 ± 5,4	-

La figura 4.1a muestra la evolución de las especies de nitrógeno N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ en el efluente. En esta figura se observa que las muestras ML1-ML4 y ML7 tuvieron la mayor concentración de N-NH₄⁺ en el efluente según el valor obtenido en cada muestra. Por otro lado, la figura 4.1b muestra el porcentaje relativo de las especies de nitrógeno. En esta figura se observa que la especie con mayor porcentaje relativo en la mayoría de muestras corresponde a N-NO₃⁻. El N-NO₃⁻ presenta una mayor concentración y baja variabilidad porcentual, a excepción de las primeras 7 muestras, dentro del conjunto de datos. El N-NO₂⁻ presenta un valor inusual en el efluente en ML4, aun así, su mayor porcentaje relativo se ha encontrado en la muestra ML6. Las muestras ML3, ML4, ML10 y ML11 presentaron valores superiores al límite de vertido de 10mg/l, para las tres especies de nitrógeno.

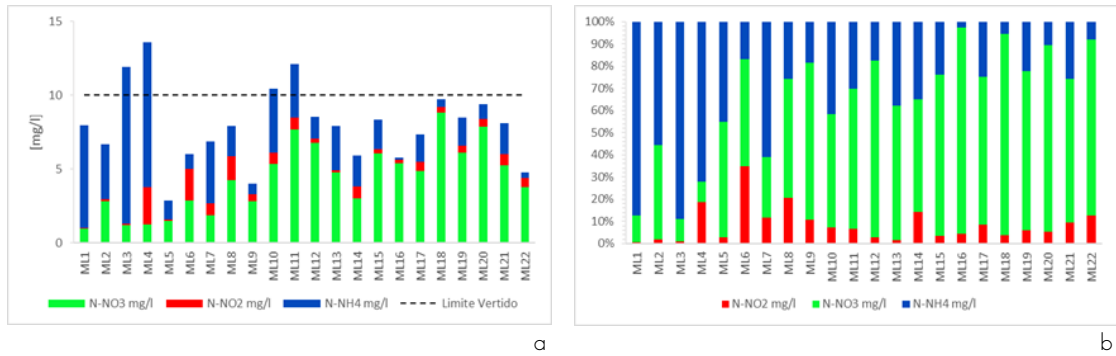


Figura 4.1 Evolución del nitrógeno inorgánico en el efluente. (a) Concentración total. (b) Representación porcentual.

La EDAR Molina de Segura tiene rendimientos de eliminación de nitrógeno similares a otras plantas. La figura 4.2 muestra que los rendimientos de eliminación de nitrógeno presentaron poca variación, considerando que dichos rendimientos fueron altos con promedios del 83% y 92% para las variables de rendimiento del nitrógeno total soluble (rNTs) y rendimiento del nitrógeno total Kjeldahl soluble (rNKTs), respectivamente.

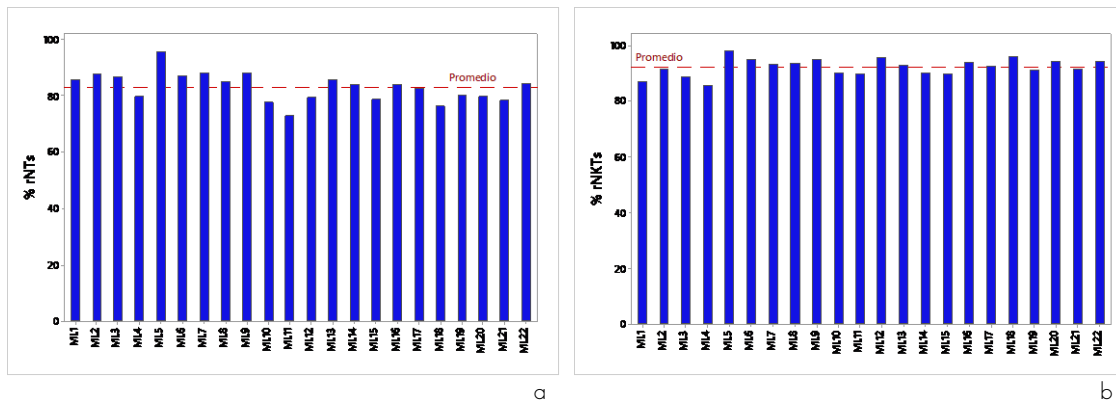


Figura 4.2 Diagrama de barras del rendimiento de eliminación del nitrógeno. (a) Rendimiento del nitrógeno total soluble (NTs). (b) Rendimiento total Kjeldahl soluble (NKTs).

En la figura 4.3 se muestra la evolución temporal de NTs, NTKs y sus rendimientos en gráficas de cajas y bigotes. Las cajas de cada período están conformadas entre 1 a 4 muestras (ver tabla 3.3). En comparación con los resultados anteriores, puede verse gráficamente en la figura 4.3a que la variabilidad mensual del máximo de NTs es baja, dado que la especie de nitrógeno que más influye sobre esta variable es la que aporta el N-NO₃⁻, mientras que en la figura 4.3.b se muestra la evolución temporal del NKTs. En esta figura se puede observar una variabilidad del máximo, la cual se ocasiona, principalmente, por la concentración que aporta el N-NH₄⁺.

En las figuras 4.3.c y 4.3.d se muestran el comportamiento mensual de los rendimientos de eliminación de nitrógeno. En estas figuras se observan menores rendimientos en la componente NTs, en comparación con NKTs. Los meses con menor rNTs fueron febrero, marzo y abril, con rendimientos menores al 75%, mientras que los meses de diciembre, enero, febrero y mayo para rNKTs obtuvieron rendimientos, inferiores al 90%. Por otro lado, puede observarse que, las muestras ML1-ML4 y ML7, donde se obtuvieron las concentraciones de salida más elevadas de N-NH₄⁺, corresponden a períodos con baja nitrificación.

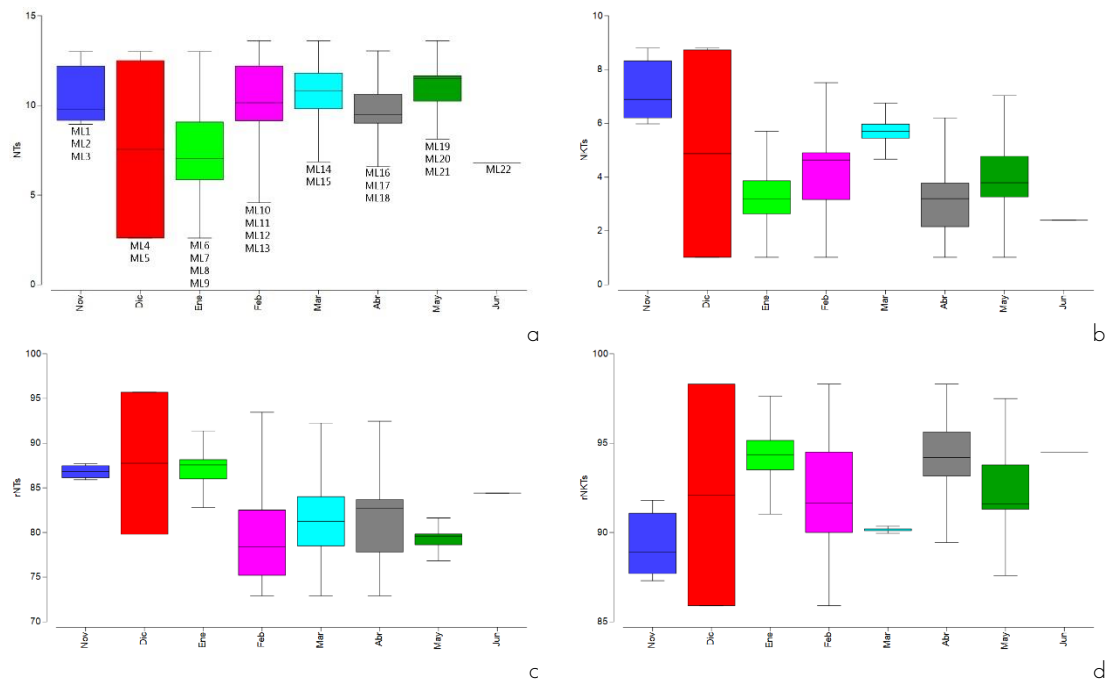


Figura 4.3 Diagrama de cajas y bigotes de nitrógeno y rendimientos. (a) Nitrógeno total soluble (NTs). (b) Nitrógeno total Kjeldahl soluble (NKTs). (c) Rendimiento del nitrógeno total soluble (rNTs). (d) Rendimiento del NKTs (rNKTs).

Posteriormente, se realizó un agrupamiento de las muestras que son similares entre ellas y disímiles de un grupo a otro, empleando para ello un análisis clúster con base en las variables de nitrógeno del efluente. La finalidad de este análisis fue entender los factores que influyen en la variabilidad de los datos del nitrógeno en el efluente. La figura 4.4 muestra el clúster construido para el conjunto de las 22 muestras. En esta figura, se observa que, de acuerdo a la distancia euclídea, las muestras ML4 y ML5, correspondientes al mes de diciembre, presentaron las mayores distancias comparadas con el resto de muestras, y donde no se aprecian similitudes importantes. Se han formado tres pares de muestras correspondientes a un mismo mes, estas son: ML1-ML3 (noviembre), ML6-ML8 (enero) y ML10-ML11 (febrero).

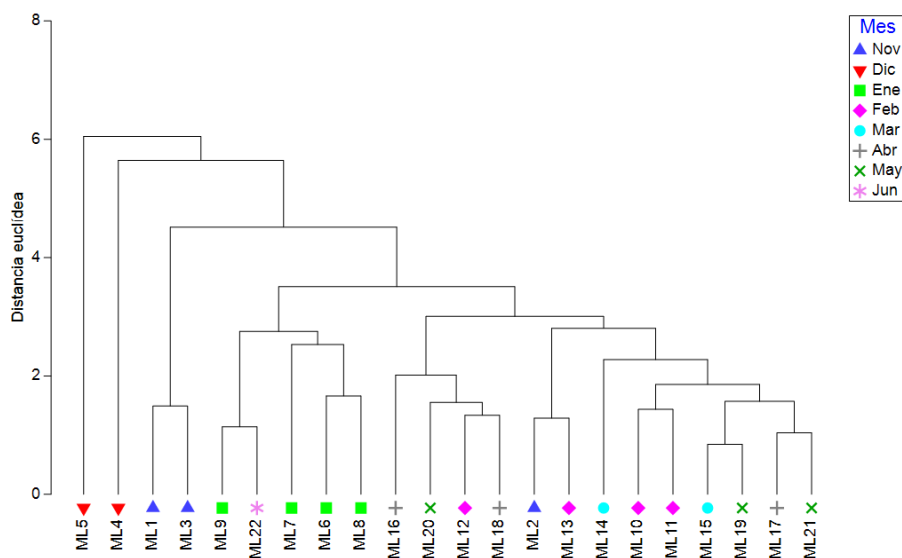


Figura 4.4 Diagrama clúster mensual de nitrógeno del efluente

El escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) fue empleado para identificar los patrones de distribución temporal de las variables de nitrógeno, es decir, encontrar cuáles son las variables que puedan explicar el agrupamiento de las muestras y las similitudes entre estas, apoyando además los resultados mediante la rutina ANOSIM. Para ello, se han representado los gráficos de burbujas correspondientes a N-NO_3^- y NKTs del efluente, que se muestran en las figuras 4.5. En estas figuras, puede observarse que hay una variabilidad temporal en los valores de estas dos componentes. Debido a que, las burbujas de los diferentes meses, representadas en varios colores, se distribuyen heterogéneamente en el plano y a su vez se presenta una variabilidad del tamaño de la burbuja, la cual representa la concentración de estas dos variables. Dado que, no todas las muestras (burbujas) se agrupan en un mismo sector del plano, estando algunas dispersas y varían de tamaño, no se observa que exista un patrón determinado sobre la evolución del nitrógeno en el efluente para el conjunto de muestras.

La figura 4.5.a muestra que el gradiente de N-NO_3^- se encuentra definido por los meses de febrero, abril y mayo, los cuales representaron los períodos con mayores rendimientos. Por otro lado, en la figura 4.5.b se muestra que el gradiente de NKTs se encuentra definido principalmente por los meses de diciembre y noviembre, meses en los cuales se presentaron valores elevados de N-NH_4^+ .

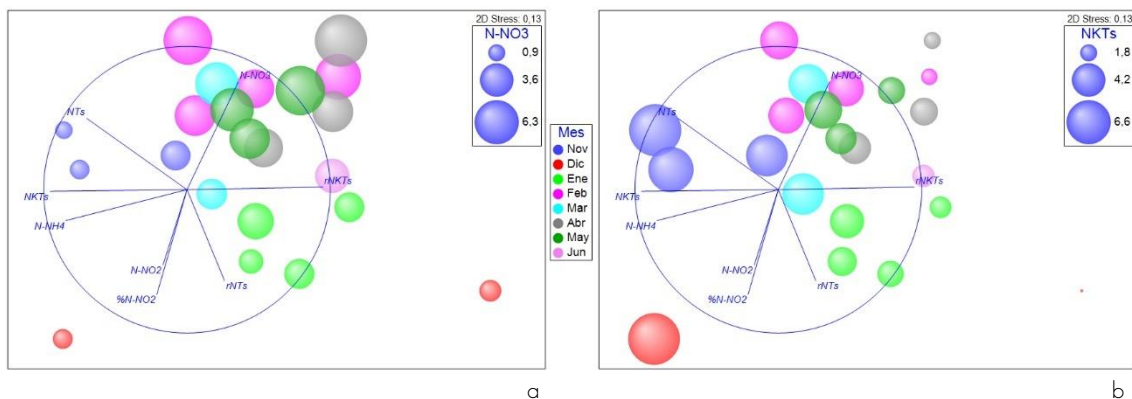


Figura 4.5 Gráfico de burbujas a partir de los componentes del nitrógeno. (a) Nitrógeno nítrico (NTs). (b) Nitrógeno total Kjeldahl soluble (NKTs).

Los resultados de la rutina ANOSIM estarían de acuerdo con los resultados observados en el nMDS, ($R_{\text{global}}=0,5$ y nivel de significación del 0,1%) donde el mes que presentó diferencias significativas fue enero con noviembre ($R=1$, $p=0,029$), enero con febrero ($R=0,792$, $p=0,029$) y enero con mayo ($R=0,833$, $p=0,029$).

Finalmente, se realizó un análisis en las relaciones de nutrientes (N y P), carga de nitrógeno y carga de fósforo. En la figura 4.6 se muestra las variaciones en las concentraciones de P-PO_4 , N-NH_4^+ , CP-PO_4 y CN-NH_4^+ del afluente al reactor. En comparación con otras plantas (tabla 4.2), los valores para la EDAR Molina de Segura han sido inferiores. De forma general, la muestra ML8 reportó el valor máximo de P y N. En la figura 4.6a se observa que el P-PO_4 presentó algunos valores muy por debajo de la media de 5,2 mg/l, mientras que en la figura 4.6b puede observarse que el N-NH_4^+ presentó mayor variación en un rango de 27,6 a 66,9 mg/l. Por otro lado, la CN-NH_4^+ , como se observa en la figura 4.6c, registró un valor promedio de 10,86 gN- NH_4^+ /kgSSVLM.d.

Considerando una relación de nutrientes C/N/P de 100/5/1, adecuada para el crecimiento celular, se observa un déficit de nutrientes en varias muestras. En la figura 4.6e y 4.6f se muestra que relaciones superiores a 100 (DBO/P-PO₄) y 20 (DBO/N-NH₄⁺), respectivamente, presentaron deficiencia, debido a que el equilibrio entre dicha relación estuvo fuera de margen, siendo más marcado el déficit de fósforo.

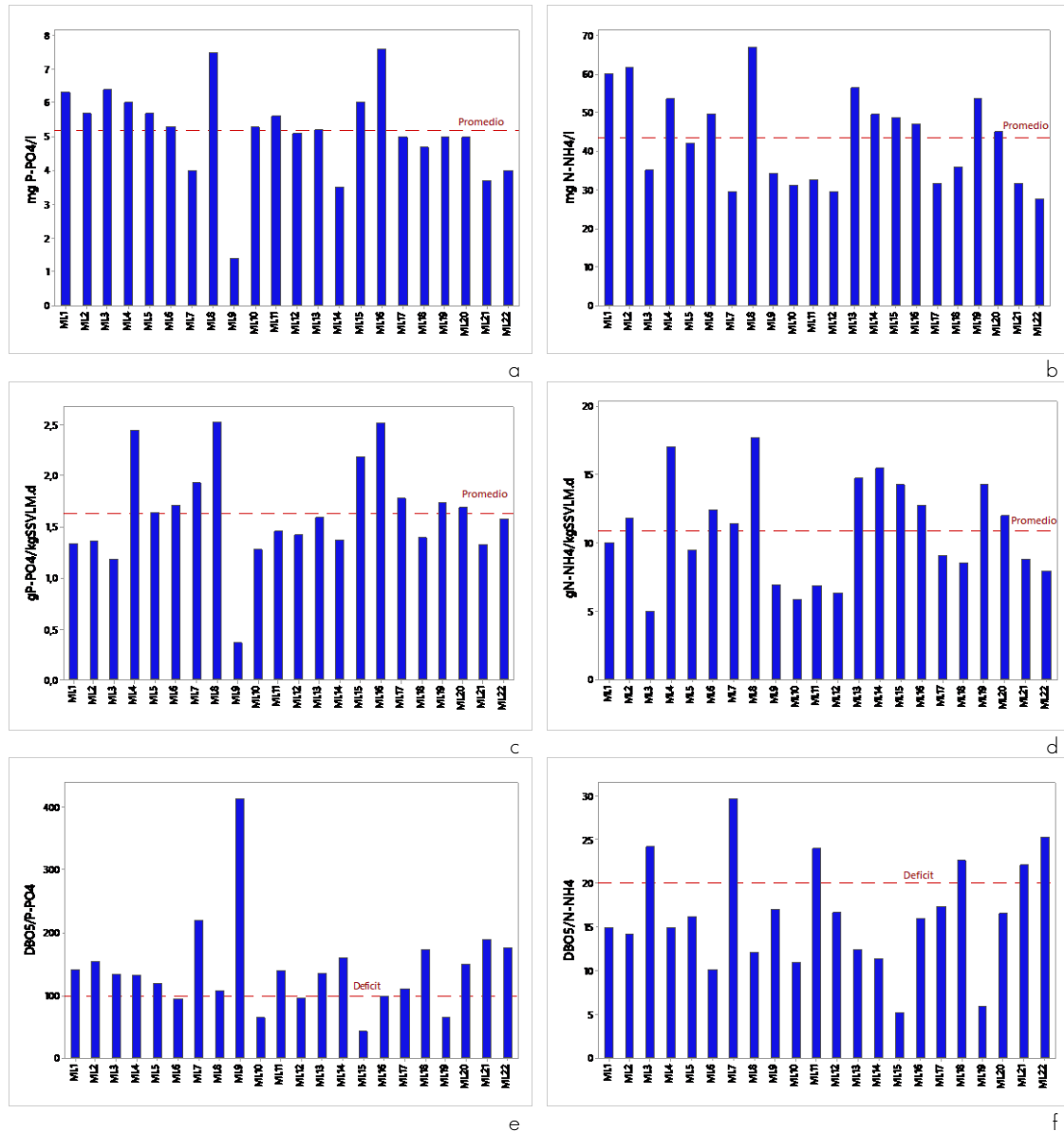


Figura 4.6 Variación de nutrientes y cargas en el afluente al reactor. (a) Comportamiento del fosfato. (b) Comportamiento del amonio. (c) Comportamiento de la carga de nitrógeno. (d) Comportamiento de la carga orgánica. (e) Relación entre nutrientes carbono y fósforo. (f) Relación entre nutrientes carbono y nitrógeno.

De forma complementaria, considerando la fórmula molecular de una bacteria como C₅H₇NO₂, podemos conocer la cantidad de nitrógeno requerido por unidad de bacteria para su crecimiento celular de acuerdo a ecuación 4.31. Posteriormente, en función de este valor se puede obtener la carga de nitrógeno que se requiere para la concentración de SSVLM según ecuación 4.32. En la figura 4.7 se muestra la relación entre la carga de nitrógeno disponible y la requerida. Si se comparan los valores de CN-NH₄⁺ disponible con los

requeridos por asimilación para crecimiento celular, se encuentra que en el 45% de las muestras han tenido necesidades de nitrógeno, incluyendo aquellas muestras que están cerca del valor requerido.

$$\frac{1 \text{ mol C}_5\text{H}_7\text{NO}_2}{113,114 \text{ g C}_5\text{H}_7\text{NO}_2} \times \frac{1 \text{ mol N}}{1 \text{ mol C}_5\text{H}_7\text{NO}_2} \times \frac{14 \text{ g N}}{1 \text{ mol N}} = 0,124 \frac{\text{gN}}{\text{gX}} = 124 \frac{\text{gN}}{\text{kgX}} \quad (4.33)$$

$$\text{CN} - \text{NH}_4^+ \text{ requerida} = \frac{124 \frac{\text{gN}}{\text{kgX}} \times Q}{V} \quad (4.34)$$

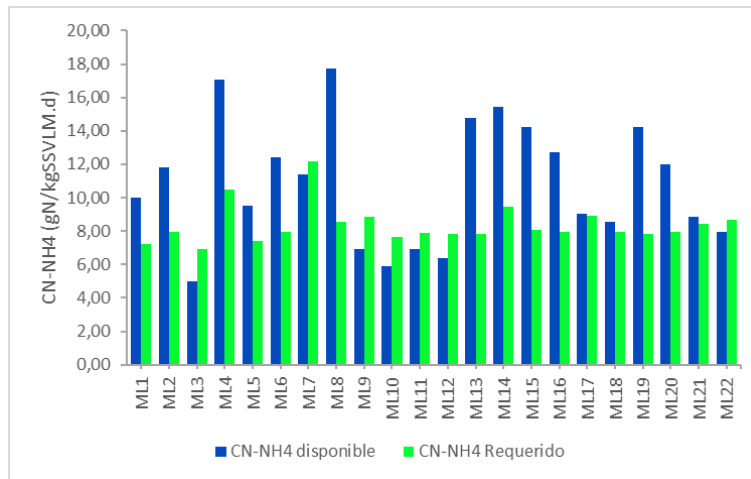


Figura 4.7 Carga de nitrógeno disponible vs requerida por asimilación de la biomasa

4.2 Relación entre las variables operacionales sobre el proceso de nitrificación

Para relacionar las variables operacionales con el proceso de nitrificación se han seleccionado la carga másica (CM), tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr), tiempo de retención celular (TRC) y tiempo de retención hidráulico del decantador secundario (TRHds), excluyendo del análisis el oxígeno disuelto (OD) por considerarse constante durante el estudio (aproximadamente 2mg/l) (anexo 1). Para cada una de las variables se obtuvieron los estadísticos descriptivos que se muestran en la tabla 4.5. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico bivalente de Pearson entre las variables fisicoquímicas y operacionales (anexo 7). En este último análisis se han encontrado correlaciones significativas entre algunas variables. Una de estas es la correlación ($r=0,53$) entre SSVLM y N-NH_4^+ del efluente, así como las correlaciones entre las especies de nitrógeno y los rendimientos ($r\text{NTs}$ y $r\text{NKTs}$), mostrando un coeficiente de correlación de $r=-0,80$ entre $r\text{NKTs}$ y N-NH_4^+ , y una correlación de $r=-0,70$ entre N-NO_3^- y $r\text{NTs}$.

Tabla 4.5 Resumen estadístico de las variables operacionales más influyentes

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	p
CM(DBO)	22	0,16	0,06	0,06	0,34	2,78	0,045
TRHr	22	18,08	3,01	11,53	22,38	2,18	0,480
TRC	22	11,60	4,40	6,05	23,55	2,71	0,062
TRHds	22	12,87	1,47	8,71	15,31	2,83	0,036

En las figuras 4.8 se muestran las variaciones del conjunto de muestras para las variables operacionales, mientras que en la tabla 4.6 se indican los valores comparativos con otras depuradoras estudiadas por Zornoza (2017). La figura 4.8a muestra que el TRC presenta muchas variaciones, siendo los meses de diciembre, enero y mayo los que han presentado menor tiempo, mientras que el valor máximo se registró para el mes de junio, mes en el que se registró, además, la temperatura máxima. El valor del TRC está dentro del rango comparado con los valores encontrados por Zornoza (2017). En la figura 4.8b se observa que el TRHr mantiene una variación más reducida, con una media de $18h \pm 3,0$, siendo mayor que otras EDAR. De igual modo, puede observarse en la figura 4.8c que la variación de los valores del TRHds es baja, registrando en la mayoría de las muestras valores por encima de 12h, valor que duplica los valores de QB, DP y CX. Por último, en la figura 4.8d puede observarse que se presentaron dos picos en ML4 y ML7 para la CM, aun así, esta variable presentó una desviación estándar baja y una media de $0,16 \text{ kgDBO}_5/\text{kgSSVLM.d}$, similar a otras plantas.

Tabla 4.6 Comparación entre variables operacionales

Variable	Unidad	QB	DP	CX
TRC	d	$10,8 \pm 5,7$	$17,2 \pm 5,4$	$7,5 \pm 5,2$
TRHr	h	$14,3 \pm 3,3$	$14,6 \pm 2,2$	$6,5 \pm 0,4$
TRHds	h	$5,8 \pm 1,5$	$6,5 \pm 1,0$	$9,4 \pm 0,6$
CM	$\text{kgDBO}_5/\text{kgSSV.d}$	$0,25 \pm 0,16$	$0,11 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,12$

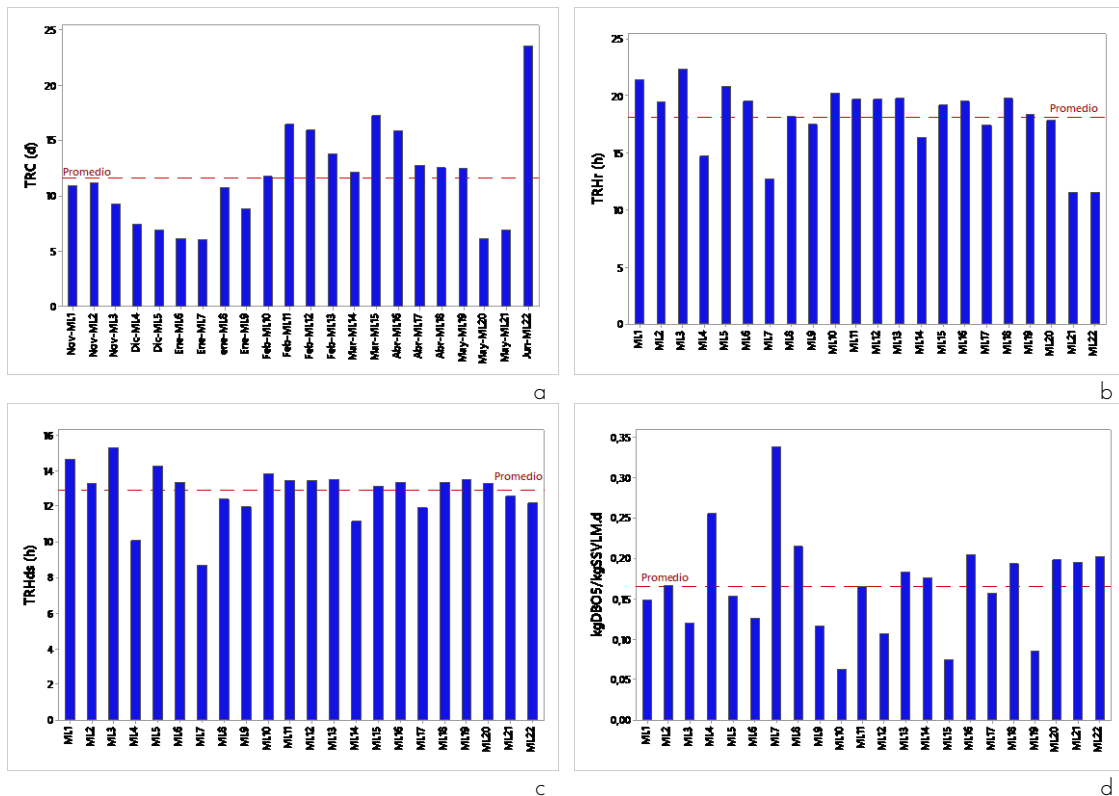


Figura 4.8 Variables operacionales. (a) tiempo de retención celular (TRC). (b) Tiempo de retención hidráulica en el reactor (TRHr). (c) Tiempo de retención hidráulica en el decantador secundario. (d) Carga másica como DBO (CM)

4.3 Variables bioindicadoras del proceso de nitrificación

Se han identificado un total de 33 especies, entre protozoos y metazoos, sin embargo 11 de estas presentaron poca frecuencia y abundancia, por lo que no fueron consideradas en el análisis estadístico (anexo 4). Además, se ha excluido la muestra ML5 de la cual no se tuvo recuento.

En la tabla 4.7 se resumen los estadísticos descriptivos obtenidos en el recuento de bioindicadores. Se ha encontrado 14 valores atípicos de acuerdo a la prueba de Grubbs (con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$). Sin embargo, algunas de estas muestras tenían muchos valores 0 (especie sin aparición), lo cual incide en el cálculo del estadístico G, por ello, la prueba fue nuevamente realizada, considerando únicamente las muestras donde la abundancia fue mayor a 0. Por lo anterior, cuando $p \leq \alpha$ se considera que existe un valor atípico, de tal modo que, de los 14 valores atípicos iniciales, se ha considerado que únicamente se presentaron valores atípicos en: *Centropyxis* sp. (ML2), *Uronema nigricans* (ML5), *Pseudochilodonopsis fluviatilis* (ML9), *Acineria uncinata* (ML10), *Arcella* sp. (ML12), *Vorticella microstoma* (ML14), *Aspidisca cicada* (ML15) y *Epistylis balatonica* (ML17).

Tabla 4.7 Estadísticos descriptivos de las variables bioindicadoras

Variable		N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	p
<i>Aspidisca cicada</i>	Acica	21	800	1312	0	4760	3,02	0,011
<i>Acineta</i> sp.	Acin	21	236,2	209,7	0	760,0	2,50	0,141
<i>Amebas desnudas</i>	Ades	21	4010	1707	1560	7280	1,92	0,975
<i>Arcella</i> sp.	Arce	21	2741	4981	0	20400	3,55	0,000
<i>Acineria uncinata</i>	Auncin	21	362	677	0	2840	3,66	0,000
<i>Centropyxis</i> sp.	Centro	21	236,2	380,5	0	1440,0	3,16	0,004
<i>Epistylis balatonica</i>	Ebala	21	468	1225	0	5640	4,22	0,000
<i>Entosiphon</i> sp.	Ento	21	221	700	0	2640	3,46	0,000
<i>Gastrotricos</i>	Gastro	21	655	1100	0	3800	2,86	0,027
<i>Holophrya</i> sp.	Holo	21	49,5	75,8	0	240,0	2,51	0,132
<i>Litonotus lamella</i>	Llam	21	127,6	192,5	0	560,0	2,25	0,357
<i>Opercularia articulata</i>	Oarti	21	2713	5053	0	15807	2,59	0,095
<i>Peranema</i> sp.	Pera	21	326	479	0	1640	2,75	0,047
<i>Plagiocampa</i>	Plagio	21	121,9	282,1	0	960,0	2,97	0,014
<i>Rotaria</i> sp.	Rota	21	87,6	83,5	0	240,0	1,82	1,000
<i>Stichotricha</i> sp.	Sticho	21	377,1	376,2	0	1440,0	2,83	0,032
<i>Tokophrya infusioformis</i>	Tinfu	21	41,9	98,4	0	440,0	4,05	0,000
<i>Trochilia minuta</i>	Tminu	21	1493	1865	0	5360	2,07	0,620
<i>Uronema nigricans</i>	Unigri	21	718	2239	0	10320	4,29	0,000
<i>Vorticella aquadulcis</i>	Vaqua	21	3248	4607	0	15680	2,70	0,059
<i>Vorticella microstoma</i>	Vmicro	21	211	493	0	2200	4,03	0,000
<i>Pseudochilodonopsis fluviatilis</i>	Pfluvi	21	110,5	164,9	0	640,0	3,21	0,003

En la figura 4.9 se muestra la frecuencia de aparición y el promedio de abundancia en aparición de las 22 especies consideradas. Según la figura, los organismos que aparecen con mayor frecuencia (>80%) son los siguientes: *Trochilia minuta*, *Vorticella aquadulcis*, *Peranema*

sp., *Aspidisca cicada*, *Acineta sp.*, *Stichotricha sp.* y finalmente amebas desnudas. Por otro lado, las especies con mayor promedio de aparición fueron las siguientes: *Uronema nigricans*, *Opercularia articulata*, *Arcella sp.*, *Vorticella aquadulcis*, y amebas desnudas.

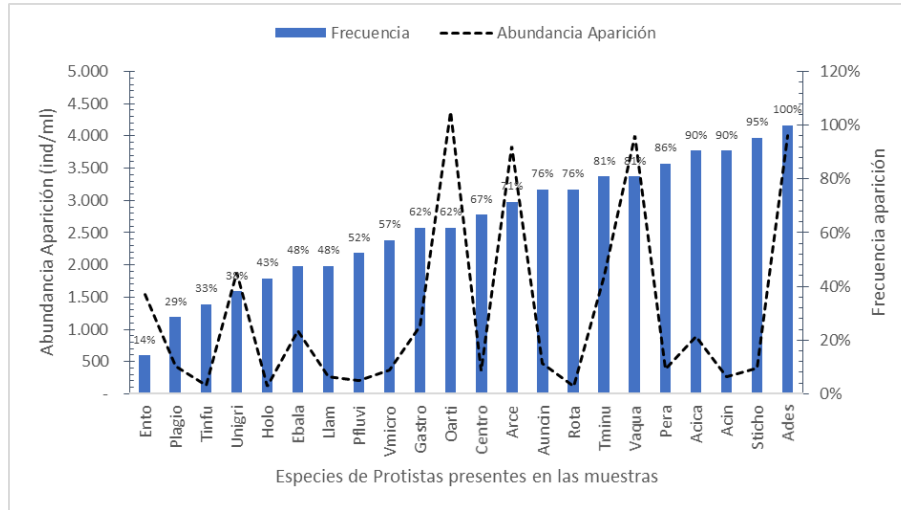


Figura 4.9 Diagrama de la frecuencia de aparición y abundancia de las especies de protistas.

En comparación con los estudios realizados para 20 depuradoras por Vasco *et al.* (2009) y 6 biorreactores por Zornoza (2017), puede observarse en la tabla 4.8 que los protistas con mayor frecuencia y abundancia son similares a los encontrados en la EDAR de Molina de Segura. Por otro lado, se encontró una diferencia en la especie *Stichotricha sp.*, la cual no fue reportada en las otras depuradoras comparadas.

Tabla 4.8 Valores comparativos de bioindicadores en estudios previos

Especie	Este estudio		Zornoza (2017)		Vasco <i>et al.</i> (2009)
	Molina	QB	DP	CX	Varias
Auncin	362±677	1720 ± 2203	1237 ± 1358	1572 ± 1883	428± 1024
Pera	327±479	268 ± 352	225 ± 295	457 ± 577	39±110
Ades	4010±1707	6476 ± 5284	3790 ± 4147	5123 ± 4927	998± 2447
Acin	236±209	66 ± 148	182 ± 114	125 ± 192	24± 64
Acica	800±1312	1616 ± 2157	639 ± 428	1572 ± 1883	2034± 5155
Tminu	1493±1865	358 ± 770	1890 ± 2004	222 ± 390	379± 1811
Vaqua	3248±4607	1235 ± 1748	310 ± 611	1117 ± 1138	1065± 2033

En la figura 4.9. se presenta un mapa de calor, para visualizar la abundancia de las diferentes especies y la relación entre cada una de las muestras. De este modo, a través de un clúster agrupamos y relacionamos semejanzas en la abundancia de cada uno de los taxones (clúster vertical) y, por otro lado, agrupamos las muestras que presentaron temporalmente similitud en la aparición de los taxones (clúster horizontal). Posteriormente, se cruzan ambos clústeres con el *shade plot* en la que se visualiza la escala de colores referida a la abundancia (escala logarítmica), donde la abundancia se incrementa de colores más claros a oscuros. A modo de ejemplo, puede observarse en la figura que la especie *Litonotus lamella* fue similar en abundancia a la especie *Tokophrya infusionum*, donde la primera reportó similitud para las muestras ML11, ML12 y ML13, perteneciendo todas al mes de febrero.

En este mapa se muestra que existe una variabilidad temporal, tanto en frecuencia como en abundancia, pues se observa que la escala de color para una misma especie cambia en el tiempo. La figura muestra que la especie con menor aparición fue *Entosiphon* sp. la cual se encontró únicamente en el mes de abril. Sin embargo, se observa en algunas muestras que entre una muestra y la siguiente existe una similitud en la frecuencia de especies. Obsérvese que en las muestras ML10 y ML11 han aparecido las mismas especies, a excepción de *Holophrya* sp y *E. balatonica*, que solo se reportaron en ML10. Por ello, consideramos que las variaciones intersemanales de las variables operacionales y fisicoquímicas no son muy marcadas y no generan alteraciones significativas en la microfauna.

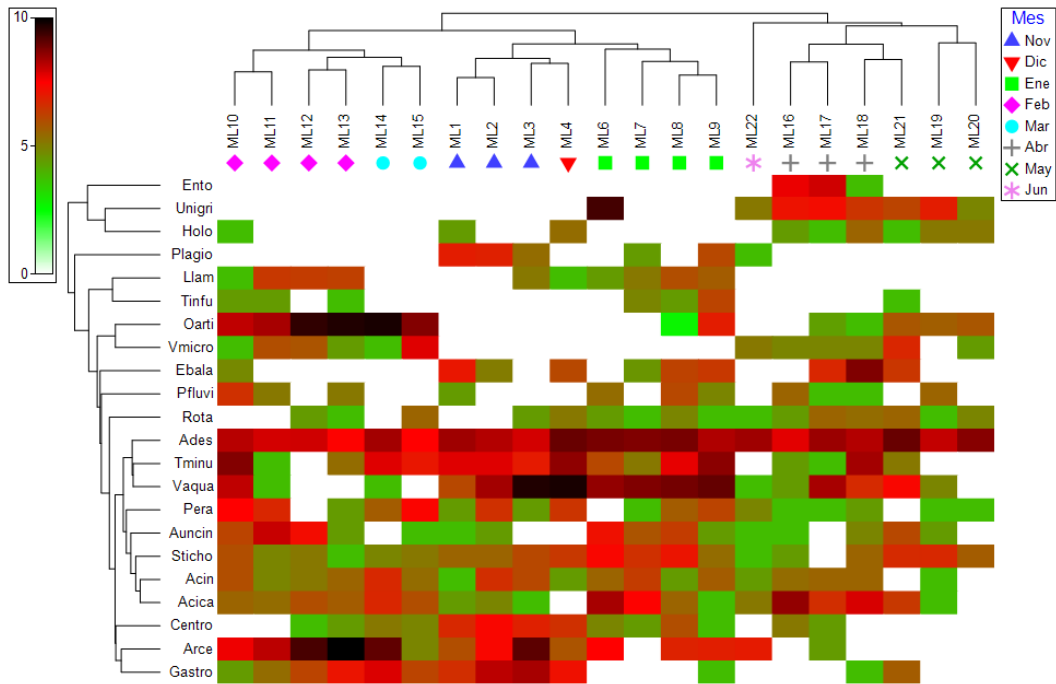


Figura 4.10 Clúster mensual de muestras y mapa de calor de bioindicadores.

El análisis exploratorio, mediante coeficiente de correlación de Pearson, de las especies bioindicadoras con mayor grado de aparición con las variables operacionales y fisicoquímicas, no ha resultado significativo. Sin embargo, se han encontrado correlaciones inversas respecto al TRC para la mayoría de especies. Las especies *Centropyxis* sp., *Plagiocampa* sp. y *Vorticella aquadulcis* parecen estar relacionadas con valores bajos de N-NO_3^- . También se ha observado que existe una relación positiva elevada entre rNTs y las especies *Centropyxis* sp. y *Plagiocampa* sp. Por otro lado, fueron varias las especies que se relacionaron de forma inversa con la SOUR_{endmax}.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para observar agrupaciones de los bioindicadores con los rendimientos del proceso de nitrificación (figura 4.11). Siendo este un primer análisis exploratorio entre estas variables. Para realizar una interpretación ambiental de las variables bioindicadoras se han empleado el DISTILM y db-RDA. Los puntos que se encuentran próximos presentan valores parecidos de las variables que determinan dichas componentes, considerando el primer componente más significativa.

La figura 4.11a muestra que las variables que se relacionan más con el primer componente principal (PC1) de rNKTs son *Arcella* sp. (0,315), *Acineta* sp. (0,268), *Litonotus lamella* (0,264) y *Centropyxis* sp. (0,254). El primer componente principal se correlaciona positivamente con estas cuatro variables. Los cuatro primeros componentes principales explican 57,3% de la variación en los datos. Por otro lado, se observa en la figura 4.11b que las variables que se correlacionan más con el primer componente principal (PC1) de rNTs son *Acineta* sp. (0,277), *Arcella* sp. (0,292), *Centropyxis* sp. (0,290), estando correlacionadas positivamente con el primer componente. Los cuatro primeros componentes principales explican 57,8% de la variación en los datos.

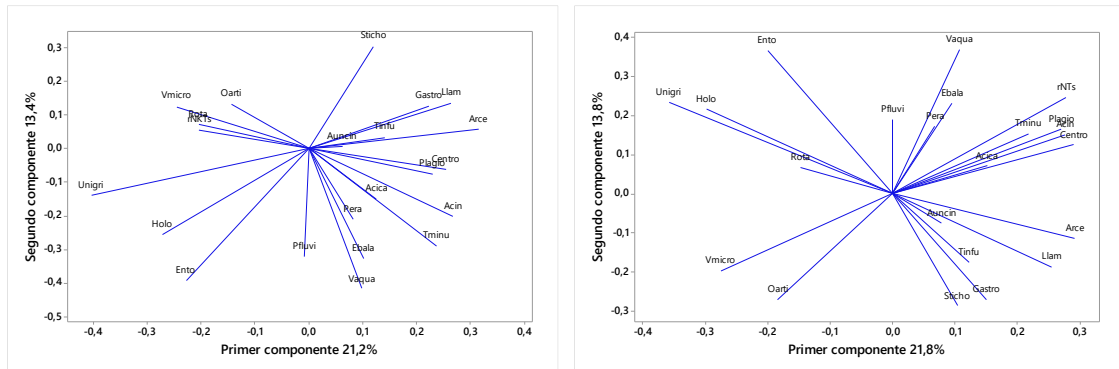


Figura 4.11 Análisis de componentes principales (ACP) de bioindicadores con rendimiento de eliminación de nitrógeno. (a) ACP para rNKTs. (b) ACP para rNTs.

4.4 Respuesta del proceso de nitrificación obtenida por respirometría

Los resultados obtenidos de las variables respirométricas se han presentado de forma tabular en el anexo 5. A modo de ejemplo, en las figuras 4.12 se muestran los respirogramas obtenidos de dos ensayos OUR y Rs para la muestra ML8. La tasa de respiración endógena de las bacterias nitrificantes (OURend.N) representó el 33% de la tasa máxima de respiración endógena para las 22 muestras analizadas.

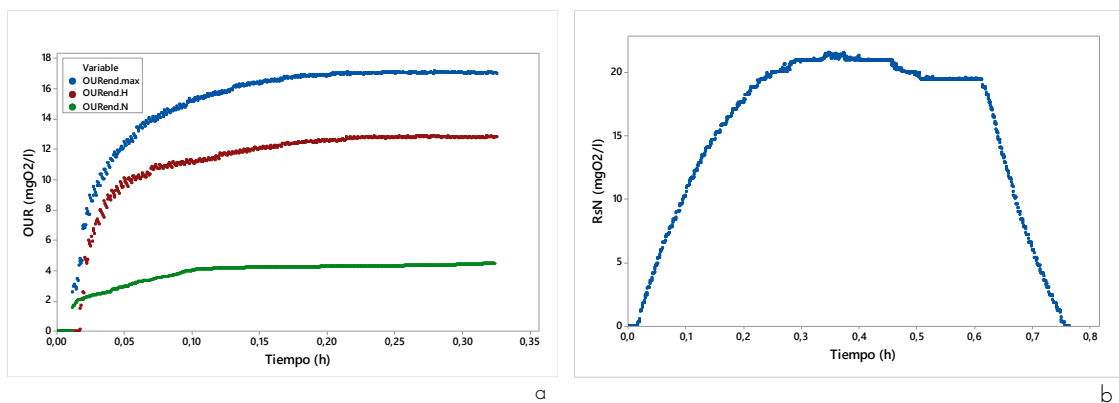


Figura 4.12 Respirogramas de la muestra ML8. (a) Tasa de respiración endógena total e individual por tipo de bacteria (OURend). (b) Tasa de respiración dinámica de bacterias nitrificantes (RsN)

Para el análisis de los resultados respirométricos fueron empleadas diferentes técnicas estadísticas como: estadísticas descriptivas, análisis bivalente, análisis mediante clúster y modelos multivariante basados en la distancia. Con estos análisis se buscó relacionar las

variables respirométricas como variables explicativas del proceso de nitrificación. En la tabla 4.9 se muestran las estadísticas descriptivas para las 11 variables respirométricas medidas y/o calculadas, encontrando un valor atípico para OURend.N y SOURN en la muestra ML16. Este valor fue debido a la baja tasa de respiración endógena de las bacterias heterótrofas (OURend.H), reportada para este ensayo. También se ha encontrado un valor atípico para RsN en la muestra ML22, obteniendo una tasa de respiración de 4,20 mgO₂/l.h.

En las figuras 4.13 se muestran las tasas de respiración dinámica (exógena) de las bacterias nitrificantes y las tasas de respiración endógena total e individual para las bacterias heterótrofas y nitrificantes. En la figura 4.13b se observa que existe una mayor variabilidad en las tasas de respiración dinámica en comparación con las tasas de respiración endógena de las bacterias nitrificantes (figura 4.13a). En principio, esto se debe a que el consumo de oxígeno para mantenimiento celular se puede considerar constante para una temperatura y una concentración de biomasa activa determinadas, mientras que el consumo de oxígeno por crecimiento celular es respuesta de la adaptación de ciertas bacterias nitrificantes a las condiciones y concentración de sustrato.

Tabla 4.9 Estadísticos descriptivos de las variables respirométricas.

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	p
OURend.max	22	18,75	4,44	12,60	27,60	1,99	0,829
SOURend.max	22	3,63	0,92	2,31	5,91	2,48	0,166
OURend.H	22	12,54	2,96	8,13	20,25	2,60	0,100
SOURH	22	2,41	0,46	1,52	3,47	2,29	0,324
OURend.N	22	6,20	3,73	2,42	19,19	3,48	0,000
SOURN	22	1,23	0,83	0,48	4,15	3,53	0,000
RsN	22	26,24	12,10	4,20	53,30	2,24	0,395
Rsp	22	5,14	2,71	0,98	11,14	2,22	0,422
AUR´	22	5,74	2,65	0,92	11,66	2,24	0,395
AUR	22	4,59	2,12	0,73	9,33	2,24	0,395
AURmax	22	7,31	3,87	0,92	17,32	2,59	0,107

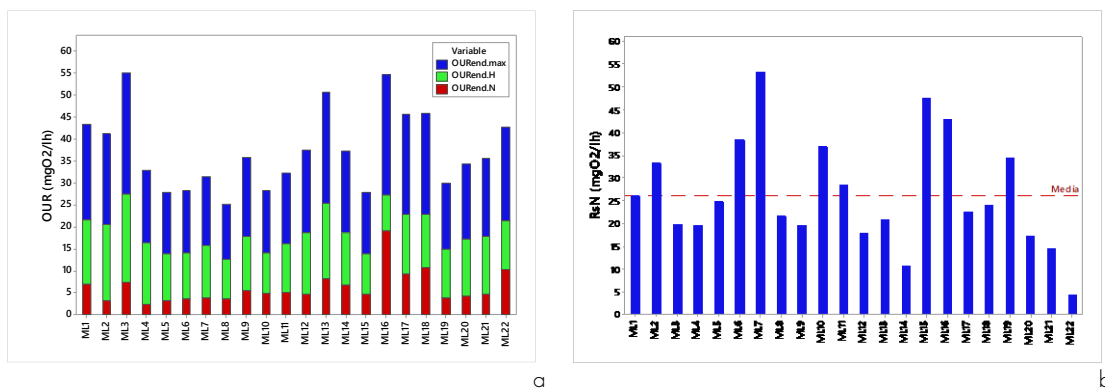


Figura 4.13 Tasas de respiración de la biomasa. (a) Tasa endógena OURend.max, OURend.H y OURend.N. (b) tasas de respiración exógena máxima de bacterias nitrificantes (RsN).

La figura 4.14 muestra la relación entre la tasa de nitrificación (AUR) y la tasa respiración específica de bacterias nitrificantes (Rsp). En esta figura se puede observar que existe una relación lineal positiva entre ambas variables. Esto indica que cuanto menor sean los SSVLM mayor será la AUR y, por lo tanto, la capacidad de nitrificación (CN), puesto que Rsp está

expresada en $\text{mgO}_2/\text{gSSVLMh}$. Una mayor tasa de nitrificación supone una mejor eliminación del nitrógeno, lo cual consideraría que en la EDAR de Molina trabajar con altos SSVLM no favorecería el proceso de nitrificación.

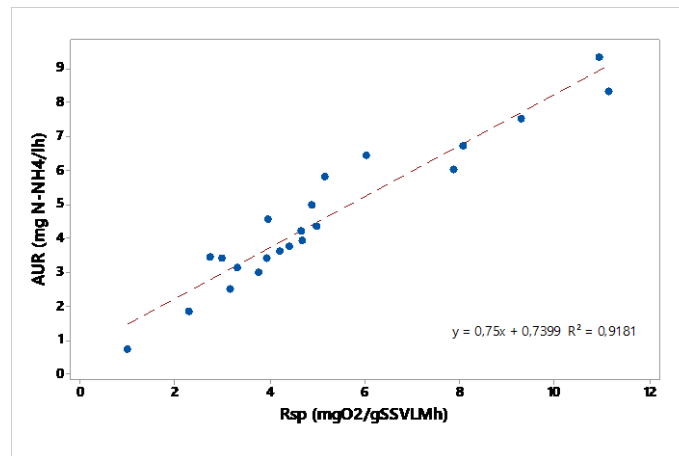


Figura 4.14 Gráfica de dispersión de la tasa de respiración específica (Rsp) vs la tasa de nitrificación (AUR).

En la figura 4.15a se muestra el agrupamiento de las muestras en función de las variables respirométricas. En esta figura se observa que solo dos pares de muestras correspondientes al mismo mes presentaron similitud de acuerdo al agrupamiento en el clúster, estas son ML17-ML18 y ML20-ML21. Por otro lado, la figura 4.15b muestra el clúster conformado con las variables respirométricas. En esta figura se observa un agrupamiento de variables según la dependencia de una sobre otra, es decir, se han agrupado una con otra según la necesidad para el cálculo de una de las variables.

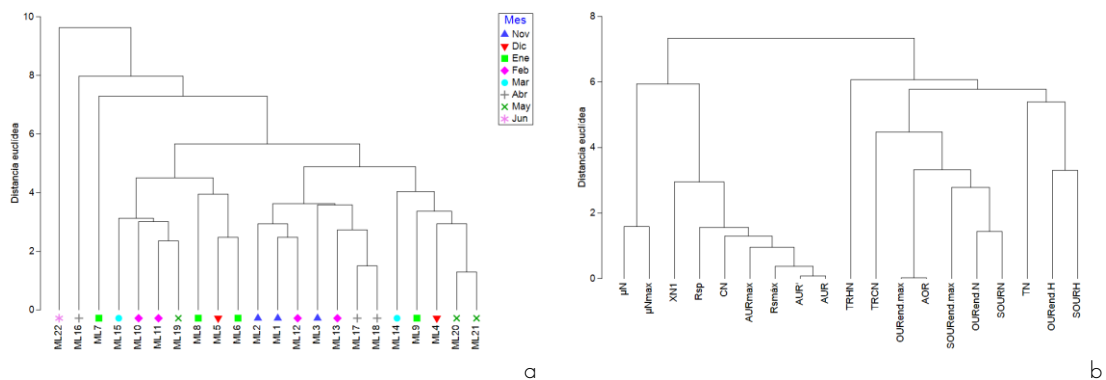


Figura 4.15 Clúster de variables respirométricas. (a) Agrupación mensual de resultados respirométricos. (b) Clúster de análisis de colinealidad de variables respirométricas.

Posteriormente, se realizó un análisis de correlaciones mediante el método de Pearson, entre las variables operacionales (VOP), fisicoquímicas del afluente (VFQa) y variables respirométricas (VR). Resaltando aquellos valores en que se ha encontrado una moderada a alta correlación ($\rho \geq 0,4$ y $\rho \leq -0,4$). En el análisis no se encontró relación entre la SOURend.N con AUR, dado que la primera variable es un valor indicativo de la biomasa nitrificante disponible para llevar a cabo la oxidación del amonio y nitrito. Se ha encontrado correlación significativa entre las variables SSVLM con CN-NH_4 ($r=-0,59$), el TRH con la CM ($r=-0,57$), el TRC con el pH ($r=0,51$) y la SOURN con el TRC ($r=0,56$). El análisis completo puede consultarse en el anexo 8.

En la figura 4.16 se muestra la relación entre AUR y CM, excluyendo la muestra ML7 por presentar un valor anómalo. En esta figura se observa que el grado de ajuste de la regresión lineal R^2 es baja, mientras que el coeficiente de correlación de Pearson es moderado ($r=-0,48$). Por otro lado, se puede observar gráficamente que existe una tendencia a que disminuya la AUR al aumentar CM.

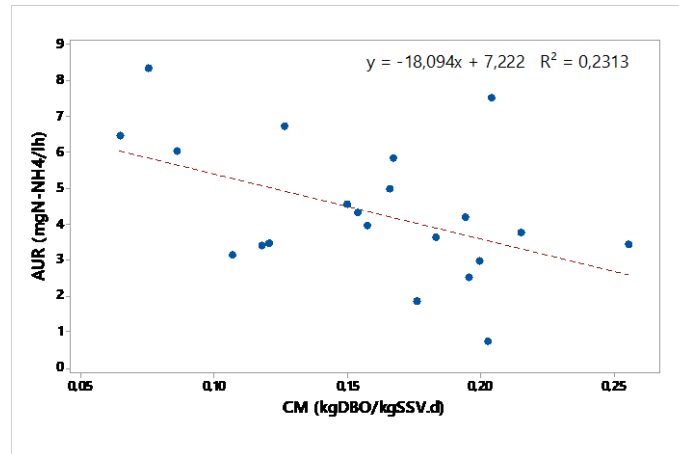


Figura 4.16 Relación de la carga másica (CM) vs tasa de nitrificación (AUR).

Finalmente, con los valores obtenidos de las tasas de respiración y nitrificación, se calcularon los valores estequiométricos y cinéticos que se resumen en la tabla 4.8, siguiendo la metodología descrita en el apartado de materiales y métodos mediante técnicas respirométricas. El valor atípico comentado anteriormente en ML22 sobre R_{sN} incide en el cálculo de X_N y este, a su vez, sobre el valor del TRC_N , presentando estas dos últimas variables valores atípicos.

Los valores porcentuales de la biomasa respecto a los SSV fueron del 4% y 16% para las bacterias nitrificantes y heterótrofas, respectivamente, siendo estos valores habituales dentro de sistemas con fangos activos con eliminación de nitrógeno. El TRC fue superior en todas las muestras comparado con el TRC_N , esto indica que se tuvo tiempo suficiente para una nitrificación completa.

Como complemento experimental, se determinó el rendimiento de las bacterias heterótrofas (Y_H), encontrando un valor promedio de 0,57 mgDQO/mgDQO y la concentración de la biomasa, calculando previamente la tasa de decaimiento según la ecuación 3.30.

Tabla 4.10 Parámetros estequiométricos y cinéticos a partir de resultados respirométricos

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	p
Y_{N,SSV}	22	0,18	0,00	0,18	0,18	4,48	0,00
Y_{N,O2}	22	0,26	0,00	0,26	0,26	4,48	0,00
X_N	22	225,0	138,90	74,80	619,80	2,84	0,03
μ_N	22	0,10	0,04	0,04	0,17	1,79	1,00
μ_{Nmax}	22	0,15	0,06	0,05	0,31	2,36	0,25
b_N	22	0,18	0,01	0,16	0,20	2,09	0,62
F_N	22	0,03	0,01	0,03	0,05	3,49	0,00
C_N	22	68,86	30,56	10,49	127,97	1,93	0,98
T_N	22	11,99	7,72	3,16	37,54	3,31	0,00
TRC_N	22	5,37	2,35	2,30	13,27	3,37	0,00
Y_H	16	0,57	0,18	0,15	0,93	2,33	0,17
b_H	22	0,25	0,02	0,22	0,30	2,13	0,56
X_H	22	844,5	176,50	546,20	1214,20	2,09	0,62

La capacidad de nitrificación de la planta en las condiciones actuales es en promedio de 68,86 mg N-NH₄/lh. Esta variable hace referencia a la cantidad de amonio por litro y hora que podrían eliminar las bacterias nitrificantes en las condiciones actuales del proceso. En el anexo 6 se presenta la matriz completa de los resultados obtenidos de este apartado.

En la tabla 4.11 se comparan los resultados obtenidos en este estudio con los bibliográficos. Observando una gran variabilidad para la tasa de crecimiento máxima de bacterias nitrificantes, por otro lado, una gran cantidad de autores han reportado tasas máximas de consumo de oxígeno de bacterias nitrificantes (R_{sN}), similares a los encontrados experimentalmente en este trabajo.

Por otra parte, los valores de decaimiento de las bacterias nitrificantes empleados, siguiendo la ecuación propuesta por Melcer (2004), se ajustan correctamente a los valores experimentales encontrados por Salem *et al.* (2006), Dold *et al.* (2005) y Melcer (2004) de 0,21 d⁻¹, 0,19 d⁻¹ y 0,17 d⁻¹, respectivamente. Manser *et al.* (2005) obtuvieron valores de 0,22 y 0,31 d⁻¹ para BOA y BON, respectivamente, mientras que Jubany *et al.* (2004) encontraron un valor de 0,14 d⁻¹ para BON.

Tabla 4.11 Comparación de valores bibliográficos de respirometría y cinéticos.

Parámetro	Símbolo	Unidad	Valor	Autor
Tasa de respiración endógena máxima	OURend.max	mgO ₂ /lh.	12,5	(Manser <i>et al.</i> , 2006)
			18,7	Este estudio
			3,8	(Liu & Wang, 2012)
Tasa máxima de crecimiento específico	μNmax	d ⁻¹	4,58E-04	(Esquivel <i>et al.</i> , 2013)
			0,10	(Kong <i>et al.</i> , 1996)
			0,15	Este estudio
			0,27	(Trapani <i>et al.</i> , 2011)
			0,31	(Petersen <i>et al.</i> , 2002)
			0,67	(Liwarska-Bizukojc & Bizukojc, 2012)
			0,6-0,8	(Henze, 2002)
Tasa de respiración exógena máxima	RsN	mgO ₂ /lh	21	(Spanjers & Vanrolleghem, 1995)
			21	(Liu & Wang, 2012)
			24	(Kong <i>et al.</i> , 1996)
			25	(Kappeler & Gujer, 1992)
			25	(Douglas, 2010)
			26	Este estudio
			29	(Manser <i>et al.</i> , 2006)
			39	(Surmacz-Gorska <i>et al.</i> , 1996)
			81,4	(Ordaz <i>et al.</i> , 2011)
120	(Guisasola, 2005)			
Tasa de rendimiento de bacterias heterótrofas	Y _H	gDOQ/ gDOQ	0,76	(Guisasola <i>et al.</i> , 2005)
			0,78	(Kong <i>et al.</i> , 1996)
			0,71	(Hoque & Aravinthan, 2010)
			0,67	(Henze <i>et al.</i> , 2000)
			0,57±0,18	Este estudio

4.5 Modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia

4.5.1 Modelo de interpretación ambiental a partir de las variables de bioindicadores

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes a las variables respirométricas mensuales indican una correlación negativa elevada de la SOURend.max con el dbRDA1 y baja para dbRDA2 (tabla 4.12). Los bioindicadores (protistas y metazoos) que se relacionan ($r > 0,40$) de forma significativa con elevados valores del SOURend.max son *Entosiphon* sp. ($r = -0,41$), *Rotaria* sp. ($r = -0,51$), *Uronema nigricans* ($r = -0,59$) y *Vorticella microstoma* ($r = -0,49$). Contrariamente, son numerosos los organismos que se relacionan de forma positiva con valores inferiores de SOURend.max, representando por *Arcella* sp., gastrotricos, *Litonotus lamella*, *Plagiocampa* sp., *Trochilia minuta* y *Vorticella aquadulcis*. En el eje dbRDA2, destaca la relación indirecta encontrada con *Stichotricha* sp y directa con *Entosiphon* sp. El diagrama de burbujas de la SOURend.max, expresado en la figura 4.17 del dbRDA, indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores inferiores a 3,5 mgO₂/gh.

Tabla 4.12 Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables respirométricas y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA

Variable	dbRDA1	dbRDA2	Variable	dbRDA1	dbRDA2
SOURend.max	-0,955	0,297	SOURend.max	-0,955	0,297
OURend.max	0,297	0,955	OURend.max	0,297	0,955
Acica	-0,24	0,09	Oarti	-0,04	-0,23
Acin	0,27	0,19	Pera	0,30	-0,08
Ades	0,02	-0,37	Pfluvi	0,15	-0,09
Arce	0,45	0,10	Plagio	0,55	0,38
Auncin	0,20	-0,37	Rota	-0,51	-0,04
Centro	0,26	0,24	Sticho	0,32	-0,48
Ebala	0,31	0,01	Tinfu	0,34	-0,29
Ento	-0,41	0,44	Tminu	0,48	0,02
Gastro	0,45	0,31	Unigri	-0,59	0,04
Holo	-0,22	0,08	Vaqua	0,44	-0,01
Llam	0,47	-0,15	Vmicro	-0,49	0,06

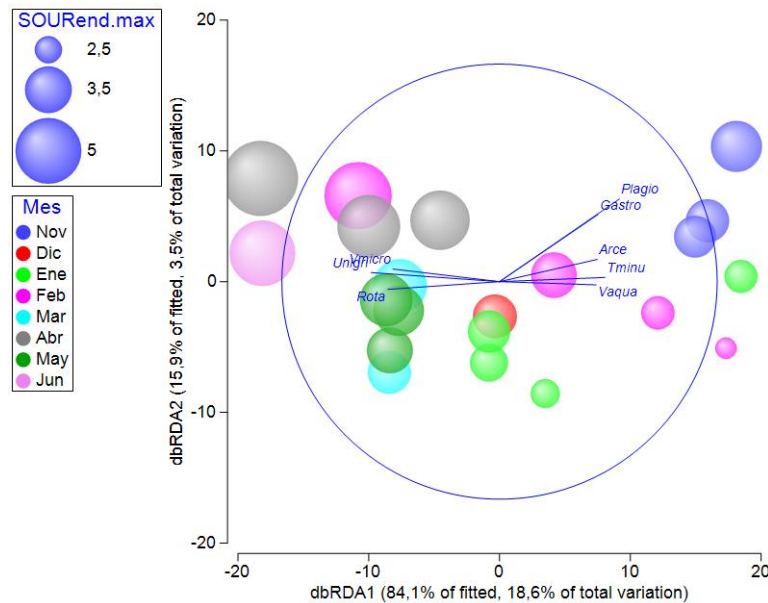


Figura 4.17 Gráfico de burbujas de la SOURend.max ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y la densidad de bioindicadores. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,50

4.5.2 Modelo de interpretación ambiental a partir de las variables de nitrógeno del efluente

El modelo lineal multivariante establece que el 38,07% de la variación de las variables de nitrógeno en el efluente fue atribuida a μNmax , OURend.H, TRC_N y TRH_N . El mayor porcentaje de contribución de estos componentes se ha observado en el primer eje del dbRDA (47,67% de la variación del modelo ajustado), explicando el 18,5% de la variación de las variables de nitrógeno en el efluente.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial, correspondientes al modelo de variables de nitrógeno del efluente del reactor, indican una correlación positiva elevada de la variable respirométrica μNmax con el dbRDA1. La variable de nitrógeno más relacionada con μNmax

es el rNKTs, cuyo coeficiente de correlación alcanza un valor de $r=0,48$. De forma contraria, NTs y NKTs están asociados ($r>0,5$) a valores inferiores a $0,2d^{-1}$ en el dbRDA1.

Tabla 4.13 Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables respirométricas y correlaciones de Pearson de componentes del nitrógeno con los ejes del dbRDA

Variable	dbRDA1	dbRDA2
μN_{max}	0,899	-0,028
OUR_{end.H}	-0,406	-0,258
NTs	-0,61	-0,05
N-NH ₄ ⁺	-0,35	-0,40
N-NO ₂ ⁻	0,32	-0,45
N-NO ₃ ⁻	-0,20	0,28
NKTs	-0,51	-0,29
rNKTs	0,48	0,28
rNTs	0,39	-0,04

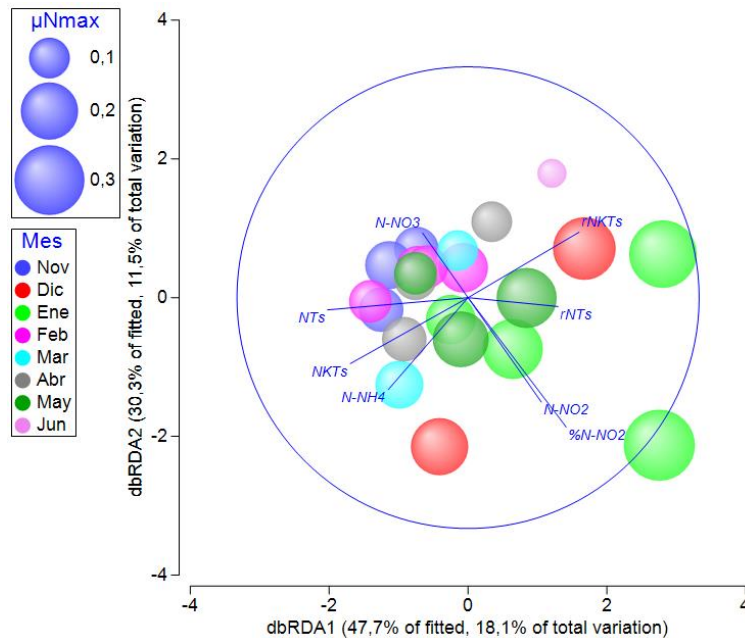


Figura 4.18 Gráfico de burbujas de la μN_{max} ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y nitrógeno del efluente. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,50

4.5.3 Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables ambientales

El modelo lineal multivariante establece que el 50,92% de la variación de las variables respirométricas fue atribuida al TRC, DBO₅/P-PO₄ y T^a. El mayor porcentaje de contribución de estos componentes se ha observado en el primer eje del dbRDA (66,39% de la variación del modelo ajustado), explicando el 33,81% de la variación de las variables respirométricas.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial, correspondientes a las variables operacionales, indican una correlación negativa elevada del TRC con el dbRDA1 y positiva elevada para dbRDA2, así como negativa elevada de la T^a con el dbRDA1 y negativa con el dbRDA2. Las variables respirométricas más relacionadas ($r>0,50$) con valores bajos de T^a y TRC son μN_{max} y AUR_{max}, al igual que sus variables antecesoras. El diagrama de burbujas

expresado en la figura 4.19 del dbRDA indica que los valores de dichas variables se encuentran influenciada por valores de la TRC inferiores a 12 días e inferiores a 20 °C para Tª, según se muestra en la figura 4.20. De forma contraria, las variables TRC_N, SOUR_{end.max} y SOUR_N, al igual que sus variables antecesoras, parecen encontrarse asociadas ($r > 0,50$) con valores superiores a 12 días y 20 °C para TRC y Tª, respectivamente. Por otro lado, las variables X_N y TRC_N se relacionan ($r > 0,50$) de forma directa con dbRDA2 con valores de 12 d y 20 °C, respectivamente, mientras que de forma indirecta se asocia μN_{max} ($r > 0,50$). La construcción de este modelo incluyó un total de 36 variables ambientales (variables fisicoquímicas del afluente al reactor + variables ambientales + relación de materia orgánica con nutrientes), las variables adicionales pueden consultarse en la tabla 8.9 del anexo 10.

En la figura 4.21 se muestra el modelo de dbRDA construido forzando la inclusión de las variables TRH_r, TRC y TRH_ds, para apoyar lo que se ha observado en el modelo anterior y el cual refleja la influencia de estas variables con el amonio y el resultado previo.

Tabla 4.14 Coeficientes de correlación múltiple parcial de las operacionales y correlaciones de Pearson de las variables respirométricas con los ejes del dbRDA

Variable	dbRDA1	dbRDA2	Variable	dbRDA1	dbRDA2
TRC	-0,678	0,673	TRC	-0,678	0,673
DBO₅/P-PO₄	-0,400	-0,676	DBO₅/P-PO₄	-0,400	-0,676
Tª	-0,617	-0,300	Tª	-0,617	-0,300
μ _N	0,62	-0,75	R _{sN}	0,63	0,24
μ _{Nmax}	0,75	-0,60	R _{sp}	0,62	0,31
AUR	0,61	0,27	SOUR _H	-0,28	-0,37
AUR'	0,61	0,26	SOUR _N	-0,57	0,25
AUR _{max}	0,69	0,30	SOUR _{end.max}	-0,61	0
C _N	0,58	0,28	T _N	-0,59	-0,22
OUR _{end.max}	-0,66	-0,14	TRC _N	-0,80	0,59
OUR _{end.H}	-0,26	-0,46	TRH _N	-0,18	0,26
OUR _{end.N}	-0,61	0,21	X _N	0,19	0,70

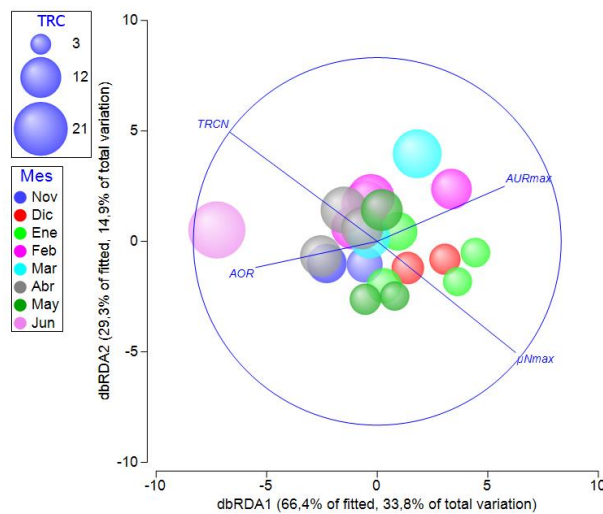


Figura 4.19 Gráfico de burbujas del TRC ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y operacionales. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,50

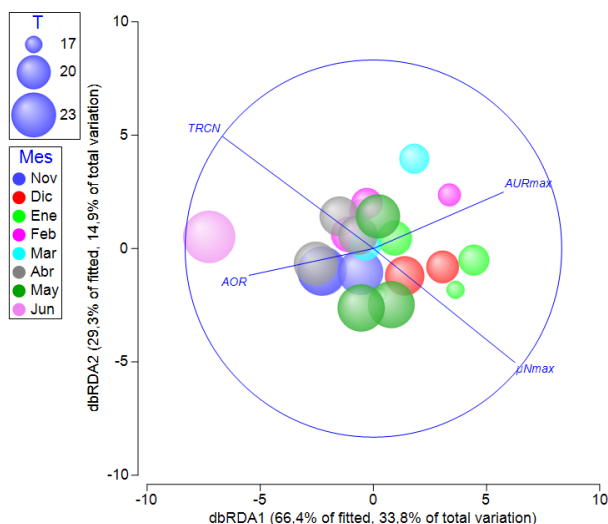


Figura 4.20 Gráfico de burbujas del T° ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y operacionales. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,50

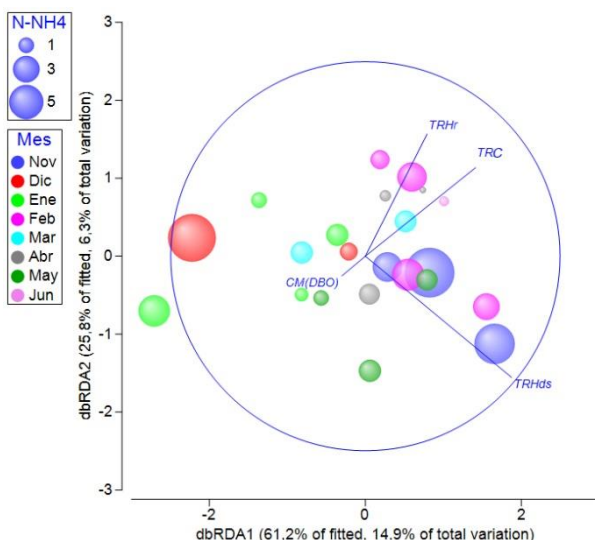


Figura 4.21 Gráfico de burbujas del $N-NH_4^+$ ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables nitrógeno efluente y operacionales. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,50

4.6 Modelo de predicción del rendimiento de nitrógeno total Kjeldahl soluble (rNKTs)

Por último, se ha empleado un análisis de varianza y un modelo de regresión lineal multivariado para realizar un análisis de las variables más significativas que explican el rNKTs. El modelo se llevó a cabo empleando los siguientes criterios:

- Fue necesario excluir las muestras ML4, ML16, ML18 y ML22, ya que el modelo propuesto obtiene valores residuales atípicos, comportamiento que hemos previsto durante todo nuestro análisis para el caso de las muestras ML4 y ML22.
- Para reducir la variabilidad de los datos y estandarizar las escalas de las variables se ha transformado logarítmicamente las variables seleccionadas (T° , pH, TRHr, TRC, CM, CN-CNH₄⁺, CP-PO₄).

- Para llegar al modelo final se ha utilizado la metodología de selección de variables “paso a paso”, con el fin de obtener las variables más significativas que nos ayudarán a explicar la variabilidad de la rNKTs.
- Se agregaron términos en el modelo de interacción entre variables. Esto es el efecto que generan en conjunto dos variables explicativas sobre la respuesta.

Una vez aplicado lo anteriormente descrito, se ha encontrado que las variables más relevantes para explicar la variabilidad del rNKTs son: la T^a con efecto negativo sobre nuestra variable respuesta (esto es mientras una crece la otra decrece), el pH, el TRHr y el TRC con efecto positivo, logrando obtener un modelo con un ajuste R² de 73,36%. Después de analizar el supuesto de normalidad, concluimos que los valores residuales siguen una distribución normal, de acuerdo a la primera gráfica de la figura 4.22. Dicho modelo es útil y tentativo para predecir el comportamiento de nuestra variable de interés (rNKTs). Los resultados del modelo se muestran a continuación:

Tabla 4.15 Resumen del modelo de predicción de rNKTs

S	R ²	R ² (ajustado)	R ² (predicción)
0,0153214	81,20%	73,36%	65,06%

Tabla 4.16 Coeficientes del modelo de predicción

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	-9,67	7,22	-1,34	0,205	
T ^a	-0,295	0,0595	-4,96	0,000	2,83
pH	7,23	3,51	2,06	0,061	210,32
TRHr	0,0607	0,0268	2,26	0,043	1,31
TRC	4,28	2,69	1,60	0,137	51764,60
pH*TRC	-2,09	1,28	-1,63	0,129	54977,48

Donde, coef: coeficiente de regresión; EE del coef: error estándar del coeficiente; Valor T: relación entre el coeficiente y su error estándar; Valor p: es una probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula; FIV: factor de inflación de la varianza; S: desviación estándar de la distancia entre los valores de datos y los valores ajustados; R² es el porcentaje de variación en la respuesta que es explicada por el modelo.

Ecuación de regresión:

$$\mathbf{rNKTs} = \text{EXP} (-9,67 - 0,295 \ln(T^a + 1) + 7,23 \ln(\text{pH} + 1) + 0,0607 \ln(\text{TRHr} + 1) + 4,28 \ln(\text{TRC} + 1) - 2,09 \ln(\text{pH} + 1) * \ln(\text{TRC} + 1))$$

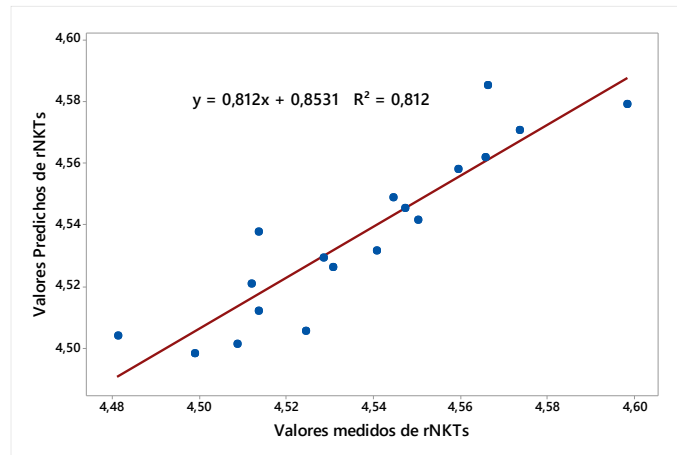


Figura 4.22 Gráfica de dispersión de valores predichos vs. valores medidos de rNKTs

En la figura 4.23 se muestra los resultados obtenidos mediante el modelo comparado con los observados. En esta gráfica se puede ver que los valores observados se encuentran simétricos a los valores obtenidos por el modelo. Lo cual indica que se ha logrado un buen ajuste para predecir los valores de rNKTs.

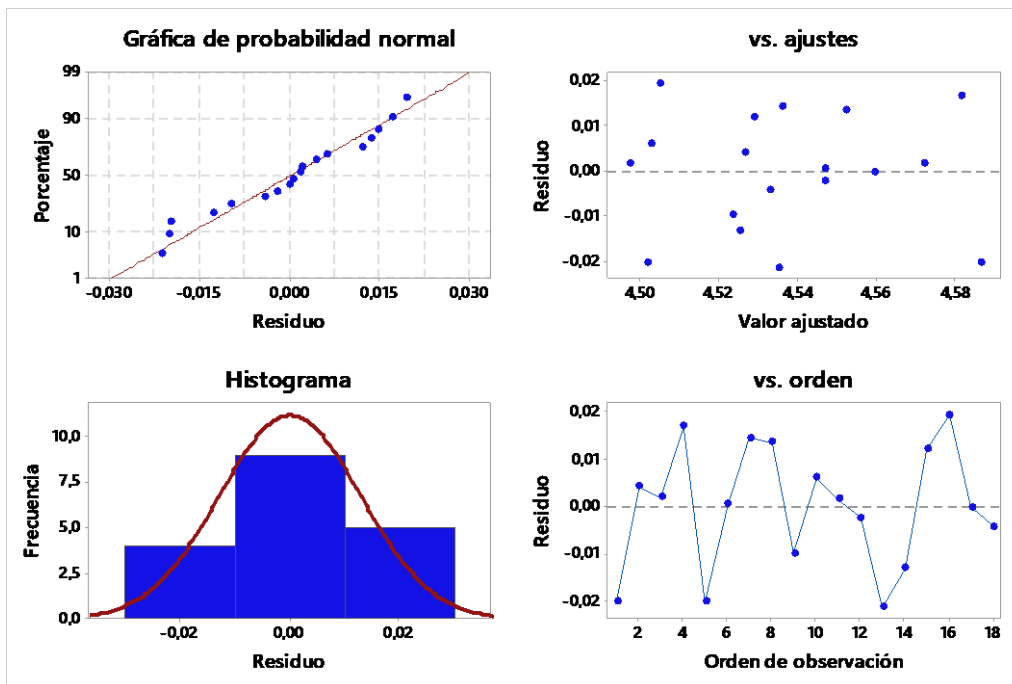


Figura 4.23 Gráficas de residuos de rNKTs

En la figura 4.23 se muestran las gráficas de residuos para ajustar el modelo de regresión. El histograma muestra la distribución de los residuos para todas las observaciones, sirviendo para determinar si los datos son asimétricos o incluyen valores atípicos. En este se puede observar que los valores residuales tienen un comportamiento según la campana de Gauss, lo cual corrobora el supuesto de normalidad. Adicionalmente, sirve para determinar si los residuos son asimétricos o incluyen valores atípicos. La gráfica de probabilidad normal de los residuos muestra los residuos vs. sus valores esperados cuando la distribución es normal, con

el fin de verificar el supuesto de que los residuos están distribuidos normalmente. En esta gráfica se observan que los residuos vs. el percentil (posición porcentual del residuo) tienen una tendencia de línea recta, el cual se evidencia con la línea ajustada (línea roja) el supuesto de normalidad. La gráfica de residuos vs. ajustes se emplea para verificar el supuesto de que los residuos están distribuidos aleatoriamente y tienen una varianza constante, en donde se observa que, en esta gráfica, se forma una nube de puntos y no se encuentran patrones que contradigan el supuesto de varianza constante o de normalidad. Finalmente, la gráfica de residuos vs. orden muestra los residuos en el orden en que se recopilaban los datos. Esto es una serie donde se muestra los residuos en el tiempo, según la recolección de cada muestra, y donde esperamos que este gráfico no tenga patrones, así como que su comportamiento sea aleatorio alrededor del Eje 0, comprobando de esta forma el supuesto de independencia en los residuales.

V.DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

Ingenieros y científicos continúan investigando los procesos biológicos que envuelven la depuración de aguas residuales, con el objetivo de conseguir un mejor entendimiento del funcionamiento y de cómo obtener el mejor beneficio de estos. En línea con lo anterior, el propósito del estudio era generar una nueva alternativa de gestión y control del proceso de nitrificación en sistemas de fangos activados, relacionando las tasas de respiración con las variables ambientales (operacionales + fisicoquímicas), rendimientos del proceso de nitrificación y la sinergia entre bioindicadores.

5.1 Influencia de las variables fisicoquímicas y operacionales sobre el proceso de nitrificación

La EDAR Molina de Segura opera con una temperatura y pH similar al de otras depuradoras de aguas residuales domésticas mediante fangos activados. Estos valores se encuentran por debajo del rango óptimo para el proceso de nitrificación. De acuerdo a lo descrito por Tchobanoglous *et al.* (2003), el pH óptimo se encuentra en el rango de 7,5-8,6, mientras que Gerardi (2002) encuentra que la temperatura óptima está comprendida entre 28-32 °C.

Tanto el pH como la temperatura se han situado en un rango de variación estrecho, las cuales no han mostrado relaciones importantes en una mejor tasa de nitrificación, observándose que no existe una relación directa mediante el coeficiente de correlación de Pearson entre estas variables. De acuerdo con algunos autores, la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes se incrementa en un 10% a razón de cada grado de aumento en la temperatura (Gerardi, 2002). Sin embargo, tal y como indica Carrera (2004), es difícil cuantificar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de nitrificación, dado que el factor de temperatura depende de: la velocidad en los cambios de temperatura, parámetros de operación de la planta depuradora y concentración de biomasa. Adicionalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos por Douglas (2010), el efecto de la temperatura podrá observarse cuando el rango estudiado es amplio, obteniendo un rango óptimo del proceso de nitrificación.

Una diferencia significativa encontrada en la EDAR de Molina es que algunas de las variables operacionales superan los valores habituales, como es el caso de la concentración de SSVLM, el TRHr y el TRHds, además de presentar déficit de nutrientes (N y P) para el crecimiento celular. Aun así, los rendimientos encontrados de eliminación de nitrógeno son elevados y se encuentran dentro del rango comparado con otras plantas reportadas en el estudio de Zornoza (2017).

Las muestras ML1, ML2, ML3, ML4 y ML7 registraron la mayor concentración de amonio en el efluente, encontrándose relacionadas con valores elevados de NKTs en el afluente ($r=0,43$) y de SSVLM ($r=0,53$). Por otro lado, la temperatura de estas muestras corresponde a época invernal, sin embargo, como se comentó anteriormente, la T^a no incidió en mejores rendimientos de eliminación de nitrógeno. Dado que se operó con altos valores de TRC, este compensó la influencia de la temperatura sobre la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes, observando que la menor temperatura fue registrada para la muestra ML9 y el

rendimiento para esta fue superior al de las muestras iniciales. Adicionalmente, las muestras ML1 y ML22 registraron las temperaturas más elevadas dentro del conjunto de muestras, sin embargo, estas no coinciden con los mayores rendimientos de eliminación de nitrógeno. Lo anterior puede evidenciarse mediante el coeficiente de correlación de Pearson, el cual no mostró correlación directa significativa entre la T^a y la AUR. La baja influencia de la T^a sobre el proceso de nitrificación puede deberse a altos valores del TRC y TRHr con que opera la planta, además del estrecho rango de valores que tomó esta variable.

Durante el período estudiado todos los meses presentaron valores de NTs por encima del límite de vertido (10mg/l), de acuerdo a la Directiva 91/271/CEE. Los nitratos, a excepción de las primeras cuatro muestras y ML7, aportaron la mayor cantidad de nitrógeno en el efluente (entre amonio, nitratos y nitritos), encontrando esta relación normal en un proceso de fangos activados con nitrificación y en comparación con otras EDAR. El rNTs presenta una ligera diferencia con el rNKTs, debido a la contribución de la variable $N-NO_3^-$ sobre el primero. Los valores del efluente de $N-NO_3^-$ pueden deberse a menores niveles de rendimiento de la desnitrificación. Por ello, los valores del $N-NO_3^-$ del efluente no pueden ser empleados para determinar la capacidad de nitrificación en la EDAR, pues la EDAR Molina opera bajo un sistema A/O.

El resultado obtenido del análisis clúster es que no existen similitudes en las características de nitrógeno en el efluente, estando probablemente relacionado con el NKTs del afluente al reactor. La agrupación de muestras a partir de la concentración de nitrógeno en el efluente mostrada en el nMDS corrobora las observaciones previas sobre estos componentes. Se muestra una correlación inversa entre el NKTs y el amonio con los nitratos, es decir, que los meses donde se reportó una concentración más elevada de amonio corresponde a aquellos meses que reportaron una concentración más baja de nitratos y viceversa. Lo anterior se relaciona con los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos entre rNTs y rNKTs con los $N-NO_3^-$, quienes se relacionan de forma inversa ($r=-0,70$) y de forma directa ($r=0,33$), respectivamente.

Las correlaciones encontradas mediante el análisis bivalente de Pearson indican una relación positiva entre SSVLM y $N-NH_4^+$ del efluente. Esto supone que, bajo las condiciones de operación de la planta, especialmente a elevados TRHds, la biomasa que es recirculada al reactor presenta estrés ambiental y con ello una menor actividad. Esto puede deberse a que las bacterias nitrificantes permanecen mucho tiempo en condiciones anóxicas y anaerobias, donde su tasa de crecimiento se ve reducida y se produce lisis por mantenimiento celular. De acuerdo a Blackburne *et al.* (2007), para lograr la nitrificación completa y evitar la acumulación de sustrato, el TRC dependerá del crecimiento de las bacterias nitrificantes. Dado que la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes es tan baja, cuando estas son recirculadas al reactor, no logran tener las condiciones óptimas para crecer y eliminar el amonio de forma significativa. Evidencia de esto son los resultados obtenidos por el grupo de química y microbiología del agua adscrito al IIAMA, mediante técnica FISH en la que la fracción nitrificantes en la mayoría de muestras es 0 o menor a 1.

El coeficiente de correlación encontrado entre el pH y TRC ($r=0,51$) puede deberse a lo anteriormente citado, en donde la actividad nitrificante puede explicar dicha relación. Durante el proceso de nitrificación se reduce la alcalinidad del medio y, por lo tanto,

disminuye el pH, tal y como han observado en su estudio algunos autores (Liwarska-Bizukojs & Bizukojs, 2012). De tal modo que, si el pH aumenta, puede deberse a que las bacterias nitrificantes reduzcan su actividad cuando el TRC es elevado, no siendo necesario que se deba simplemente a esta razón. Esto implicaría además que haya una influencia en la disminución de la actividad nitrificante por altos valores de los SSVLM. No se observó correlación significativa con el rNKTs y el TRC, relación que tampoco se observó en el estudio de Zornoza *et al.* (2012).

Un punto crítico de operación de la EDAR de Molina es que se asocia a la deficiencia de nutrientes para el crecimiento celular, a partir de la relación teórica de C:N:P (100:5:1). Son numerosas las muestras en las que se encontró niveles de nitrógeno y fósforo inferiores a los requeridos para crecimiento celular. La ausencia de N y P supone una disminución en la tasa de crecimiento de las bacterias, especialmente en las bacterias nitrificantes, las cuales poseen una menor tasa de crecimiento que las bacterias heterótrofas (Guisasola, 2005). El hecho de que exista más biomasa que sustrato implica que se debe trabajar con menores concentraciones de SSVLM, lo que implica reducir el TRC. Por otra parte, la estrategia implementada por la planta para reducir los olores de sulfuro de hidrógeno, mediante cloruro férrico, estarían causando la precipitación del fosfato y, por lo tanto, sea esta la razón de que haya más déficit en este nutriente.

5.2 Bioindicadores del proceso de eliminación del nitrógeno

A medida que van cambiando las variables del proceso y variables fisicoquímicas se va modificando la estructura biológica del fango activado. Establecer aquella variable que tiene mayor peso en la variabilidad de estas poblaciones es en muchos casos difícil de determinar. Las relaciones encontradas no son causalidades estrictas de la frecuencia y abundancia de una especie, por lo que no se pueden hacer generalizaciones al respecto. En el caso del análisis bivariado, la relación encontrada no implica causalidad y, por lo tanto, no implica necesariamente que exista una relación directa significativa, permitiendo tan solo establecer asociaciones generales.

La especie *Aspidisca cicada* ha sido reportada por Hamm (1964) como una especie indicadora de buen proceso de nitrificación, sin embargo, dicha especie es reportada por Curds & Cockburn (1970) como frecuente en sistemas de depuración, mientras que Poole (1984) encuentra la presencia de *A. cicada* en un amplio rango de calidad del efluente, especialmente en sistemas de plantas donde no se realiza un proceso de nitrificación, hecho que rectifica Zornoza (2017), el cual encontró que *A. cicada* está asociada a valores elevados de $N-NH_4^+$ y bajos valores de rNKTs. En este estudio *A. cicada* ha sido la cuarta especie con mayor frecuencia de aparición estando asociada de forma moderada positiva con rNKTs.

Dos géneros de amebas testadas, *Arcella* y *Euglypha*, están comúnmente presentes en fangos activados. Estos protistas se encuentran normalmente en reactores aerobios de plantas con eliminación de nitrógeno (Poole, 1984). Las amebas testáceas son más abundantes o frecuentes en fangos con baja carga, elevado TRC y altos niveles de OD, lo cual permite una nitrificación completa (Madoni *et al.*, 1993). Adicionalmente, Zornoza (2017) encontró al género *Arcella* sp. asociada a una baja concentración de amonio en el efluente, considerando esta especie como buen bioindicador del proceso de nitrificación. Bajo estas condiciones,

Arcella ha presentado una frecuencia del 71%, indicando según las diferentes observaciones de los autores citados que la calidad del efluente es excelente. Por otra parte, *Euglypha* solo fue reportada en una de las 22 muestras.

Vorticella microstoma, ha tenido una frecuencia de aparición del 57%, cuya especie está asociada a elevados tiempos de retención y bajas cargas (Esteban *et al.*, 1990). Adicionalmente, Zornoza (2017) ha encontrado que *V. microstoma* está relacionada con bajos rendimientos del proceso de nitrificación. Por otro lado, la presencia de *Peranema* sp. se asocia, en general, a edades del fango elevadas (Salvadó, 1994). Los resultados para las especies *Uronema nigricans* y *Rotaria* sp. concuerdan con los obtenidos por Zornoza (2017), quien reporto que *U. nigricans* se relaciona con elevados TRHds y *Rotaria* con elevados TRC.

En cuanto a *Opercularia articulata*, ha sido la especie más representativa por su abundancia, estos protozoos ciliados han sido reportados con una mayor capacidad de sobrevivir en ambientes con estrés que otros protistas (Antonietti *et al.*, 1982; Becares *et al.*, 1994). *Opercularia articulata* presentó una correlación positiva con NO_3^- ($r=0,59$) y negativa con rNTs ($r=-0,48$). Esta especie ha sido reportada por Zornoza (2017) como una especie bioindicadora de buenos rendimientos de eliminación de nitrógeno, estando asociada a bajos valores de amonio en el efluente y un excelente bioindicador de elevado TRC. Dicha cita confirma que, dado los altos rendimientos de eliminación de nitrógeno y TRC, *Opercularia articulata* haya sido la especie con mayor abundancia de aparición, además de observarse la relación entre *O. articulata* y rNKTs en el ACP.

Las especies bioindicadoras encontradas en este estudio en frecuencia y abundancia son similares a las encontradas por otros autores. Zornoza (2017) encontró que las especies con una frecuencia mayor al 80% fueron amebas desnudas y *Arcella vulgaris*, *Bodo* sp., *Aspidisca cicada*, *Acineria uncinata* y *Vorticella aquadulcis*. En el estudio realizado por Vasco *et al.* (2009) se ha encontrado relación (a excepción de *Stichotricha* sp y *Peranema* sp.) con las especies que presentaron una alta frecuencia de aparición y las reportadas en este estudio. Vasco *et al.* (2009) ha encontrado después de las amebas desnudas y testaceas que *Aspidisca Cicada* es la especie con mayor frecuencia (71,7%), seguida de *Acineria uncinata* (66%). No obstante, los valores reportados en su estudio para *Aspidisca cicada* están por encima del rango estudiado y los presentados por Zornoza (2017). Otros autores han reportado valores similares de *Trochilia minuta* (Dubber & Gray, 2011), *Vorticella aquadulcis* (Hu *et al.*, 2013), *Aspidisca cicada* (Santos *et al.*, 2014), y finalmente amebas desnudas (Pérez-Uz *et al.*, 2010).

La abundancia de especies con una frecuencia de aparición mayor al 80%, en comparación con otras plantas, presenta un valor medio elevado en la especie *Vorticella aquadulcis*. Su presencia está asociada a efluentes de buena calidad (Curds, 1982). Sin embargo, los resultados obtenidos por Zornoza (2017) han sido que *V. aquadulcis* es un bioindicador de bajos rendimientos del proceso de nitrificación, lo cual reflejaría el resultado obtenido en este estudio, donde se obtuvo una correlación directa moderada entre el N-NH_4^+ del efluente con *V. aquadulcis*.

5.3 Respuesta del proceso de nitrificación obtenidas por respirometría

La variabilidad de los resultados respirométricos está influenciada principalmente por las variables operacionales y fisicoquímicas, las cuales influyen a su vez en la actividad biológica de los microorganismos que componen el fango activado. Se han encontrado en algunos casos relaciones inversas consideradas tradicionalmente entre la actividad nitrificante y la influencia de las variables ambientales. Adicionalmente, en función de las condiciones en que se realizan los ensayos respirométricos se pueden obtener resultados diferentes. La correcta ejecución de los ensayos y un adecuado protocolo determina los mejores resultados equiparables en el estudio.

Contrariamente al estudio llevado a cabo por Madoni *et al.* (1993), en el que se encuentra que una concentración elevada de los sólidos suspendidos del licor mezcla (SSLM) favorece el proceso de nitrificación, no se ha encontrado dicha relación en este estudio. Existe una relación positiva ($r=0,53$) entre SSVLM y $N-NH_4^+$ del efluente, indicando que una elevada concentración de SSVLM supone una menor eliminación de amonio, pues existen otras variables operacionales que influyen en dicha relación, causando un efecto contrario al conocimiento tradicional (más biomasa mejora el proceso). De aquí puede establecerse la variabilidad de los resultados obtenidos por respirometría, dado que están influenciados por la fracción de bacterias nitrificantes que se hayan desarrollado en el licor mezcla.

Por otro lado, se ha encontrado solamente un valor atípico en la muestra ML22 para la variable R_sN , la cual pudo deberse a varios factores, entre ellos, la contaminación de la muestra durante su recolección y la ausencia de cámara de aire en el recipiente, provocando estado anóxico y muerte celular. Por otro lado, fallos de lectura de los sensores del equipo respirométrico, o mal ejecución del ensayo, también son posibles. Respecto al valor atípico en ML16 para $OUR_{end,H}$, no se tiene certeza, dado que la línea base del ensayo se mantuvo y se comprobó que el fango estuviese en condiciones endógenas.

La dispersión en las lecturas de la tasa de respiración R_sN puede ser explicada por la variabilidad de las variables ambientales, las cuales afectan a su vez a la fracción de bacterias nitrificantes presentes en el medio. Sin embargo, los altos rendimientos de eliminación de nitrógeno $rNKTs$ (85-98%) indicarían una actividad nitrificante estable. Considerando el déficit de nutrientes, debido a las bajas cargas ($CN-NH_4^+$ y $CP-PO_4$), y a la reducida tasa de crecimiento de la biomasa nitrificante, lo cual se ha demostrado a partir de la poca abundancia de bacterias nitrificantes, el amonio podría estar siendo eliminado en gran parte por asimilación, por bacterias heterótrofas principalmente. En este sentido, la estabilidad del rendimiento de eliminación del nitrógeno podría ser explicado por lo anterior y, en tal caso, sustentaría el hecho de que no haya patrones importantes en la variabilidad de los bioindicadores, dado que el rango de eficiencia es muy estrecho y no varía de forma tal que indique cambios significativos en la población de protistas y metazoos.

Baeza *et al.* (2002) y Quintela & Ro (2003) han propuesto emplear la OUR como un parámetro de control primario del proceso de fangos activados. Con base en esto, una mayor $OUR_{end,N}$ supondría una mayor actividad nitrificante y una mayor AUR. Sin embargo, no se ha encontrado una correlación directa entre estas dos variables ($r=-0,18$). La OUR permite valorar cualitativamente la actividad de la biomasa presente, es decir, la velocidad con la

cual los microorganismos consumen el oxígeno del LM, siendo esta variable un indicador de la actividad biológica del sistema. Sin embargo, de acuerdo a Ekama & Marais (1984), la tasa de crecimiento no es proporcional a la tasa de decaimiento.

La tasa de nitrificación máxima para un TRC de 20 días encontrada por Liu (2012) fue de 8,3mgN/l.h, siendo constante en un rango de OD de 2-4,5 mg/l. Además, dichos autores han encontrado una tasa máxima de crecimiento de 0,24 y 0,18 d⁻¹ para BOA y BON, respectivamente. Dichos valores concuerdan con los obtenidos en este estudio (7,61mgN/l.h y 0,16 d⁻¹, descartando el valor atípico de ML22). Sin embargo, el valor reportado por Liu & Wang (2012) para la tasa de respiración endógena (<4mg/lh) es inferior al de este estudio (18,75mg/lh). Esto puede deberse a que los valores de OUR_{end} están en función de la concentración de los SSVLM (Wentzel, *et al.*, 1991). De acuerdo con Knobelsdorf (2005) resulta más conveniente trabajar con valores de SOUR, dividiendo el valor de la OUR por los SSVLM, dado que este nuevo parámetro elimina la variabilidad producida por los cambios de la concentración de los SSV y hace posible la comparación entre sistemas.

Basados en lo descrito anteriormente y comparando los valores bibliográficos de la tasa de respiración exógena máxima (R_{sN}), la capacidad de respuesta de las bacterias nitrificantes al entrar en contacto con el sustrato será similar bajo condiciones equivalentes de T^e, pH y OD, esto quiere decir que la tasa máxima de crecimiento sigue una función de Monod. De esta forma, la tasa de consumo endógena (catabolismo) no es proporcional a la tasa de consumo exógena (R_{sN}), confirmando por tanto que no se encuentre correlación entre la OUR_{endN} y la AUR. Adicionalmente, la variabilidad de los valores de R_{sN} puede deberse a la variedad de especies de bacterias nitrificantes presentes en el fango. Según Liu (2012), las bacterias presentan características diferentes, siendo algunas estrategias de la K y otras de la r, lo cual hace que bajo las condiciones de ensayo y de operación de la planta se desarrollen diferentes grupos de bacterias. Por ejemplo, algunas bacterias son altamente tolerantes a ambientes con poco oxígeno o anóxicos (Bodelier *et al.*, 1996), lo cual permite que las bacterias que mejor estén adaptadas al medio respondan mejor durante los ensayos R_{sN}, mientras que en condiciones endógenas no hay competencia.

En el análisis clúster para las variables respirométricas se ha observado diferencias a escala temporal (intersemanal y mensual), debido a que los aglomerados no están conformados por muestras del mismo mes, a excepción de los dos pares de muestras mencionadas en el apartado de resultados. Este resultado se considera normal, dado los cambios en las variables ambientales que influyen en la actividad de las bacterias. Por otro lado, en el clúster de las variables calculadas se agruparon según la dependencia de una variable para el cálculo de otra.

La correlación entre la CN-NH₄⁺ y SSVLM fue la esperada, puesto que la CN-NH₄⁺ esta expresada en gN-NH₄⁺/kgSSVLM, por lo que una mayor concentración de SSVLM disminuye la CN-NH₄⁺. De aquí se explica que, en comparación con otras plantas, la CN-NH₄⁺ para Molina de Segura sea tan baja, pues la concentración de SSVLM es muy elevada, siendo el doble en comparación con otras plantas.

La tasa de nitrificación máxima (AUR_{max}) se encuentra inversamente influenciada por los valores de SOURH (r=-0,45). Esto indica que, cuando menor sea la actividad de bacterias

heterótrofas más amonio estará disponible para las bacterias nitrificantes y, por tanto, se incrementa la tasa de respiración de estas. Adicionalmente, se ha observado una relación inversa entre R_{sp} y AUR. Esta relación implica que, si la concentración de SSVLM disminuye, entonces aumenta la R_{sp} y, por tanto, se incrementa la AUR, hecho que se explica por el aumento de la $CN-NH_4^+$. Al tener una mayor concentración de sustrato disponible para las bacterias nitrificantes se favorece su tasa de crecimiento, aumentando la capacidad de nitrificación.

Madoni *et al.* (1993), en su estudio de asociación de las variables del proceso, observó que valores bajos de CM favorecen el rendimiento del proceso de nitrificación, hecho que corroboró Carrera *et al.* (2004), indicando que valores elevados de la CM disminuyen la velocidad de nitrificación y la fracción de bacterias nitrificantes, al existir una competencia por el sustrato. Este estudio confirma las observaciones de estos dos autores, encontrando que la capacidad de nitrificación y la fracción nitrificante se encuentra relacionada negativamente, al igual que la AUR (sin que sea una correlación significativa) con valores altos de CM. Esta relación podría ser explicada a partir de la materia orgánica, la cual favorece la tasa de crecimiento de las bacterias heterótrofas respecto a las bacterias nitrificantes. Una mayor CM favorece el metabolismo de las bacterias heterótrofas, tal y como han reportado Strotmann *et al.* (1999) y Guisasola *et al.* (2005) en sus estudios, donde han encontrado que la tasa de rendimiento de estas bacterias se incrementa cuando lo hace la CM.

El TRH tiene un coeficiente de correlación positivo con R_{sN} , AUR y AURmax, mientras que el TRHds se relaciona de forma inversa con la tasa de crecimiento. Esto se debe a las condiciones de oxígeno disuelto, donde en el decantador secundario predomina un estado anóxico o anaerobio, desfavoreciendo el crecimiento. Además, en el reactor predomina condiciones aerobias, lo que permite una mejor actividad y favorece el crecimiento.

Una de las variables claves del proceso de nitrificación es el OD y el TRC, las cuales pueden afectar en gran medida este proceso. En el presente estudio, la concentración de OD real en el reactor no fue evaluada, utilizándose un valor medio de $2 \text{ mgO}_2/\text{l}$. Por ello, no ha sido posible relacionar la variabilidad del rendimiento y tasas de respiración (AUR) con la influencia de la concentración del OD en el reactor. Stenstrom & Poduska (1980) señalan la influencia de la concentración de OD en la variabilidad del proceso de nitrificación, afectando de forma diferente a las BOA y BON. Por otro lado, se ha encontrado que las BOA tienen una tasa de crecimiento de 2,56 veces mayor que las BON en condiciones de OD bajo ($< 1.0 \text{ mg/l}$) (Tokutomi, 2004).

5.4 Modelo lineal de variables ambientales y variables respirométricas

La EDAR Molina opera en condiciones muy extremas para el desarrollo de las poblaciones de bacterias nitrificantes: concentración elevada de SSVLM, TRHr y TRHds, y baja $CN-NH_4^+$ de entrada al reactor. Dichas condiciones ambientales corroboran la baja abundancia encontrada de bacterias nitrificantes, determinada mediante la técnica FISH.

El modelo lineal construido indica que las variables operacionales que mejor representan los resultados obtenidos en las variables respirométricas han sido el TRC y la T^a . Dentro del rango estudiado, las mejores tasas de nitrificación se presentaron cuando el TRC estaba cercano a

los 12 días y la T^a estaba cercana a los límites inferiores del rango estudiado. La ausencia de una variación significativa en la temperatura con la unión de las variables operacionales, como TRC y TRH, podrían influir en la reducción de la tasa de nitrificación, al disminuir la temperatura. Por todo ello, se recomienda trabajar con menor TRC, aumentando la purga y disminuyendo los SSLM, con el fin de poder mejorar los niveles de nitrificación, dentro del rango de trabajo y condiciones favorables de operación.

El modelo lineal sustenta la correlación encontrada entre SSVLM y $N-NH_4^+$ del efluente, dado que una elevada concentración de SSVLM supone un aumento en el TRC. De tal forma, los valores más altos de la AUR_{max} y la μ_{max} corresponden a bajos TRC y, por lo tanto, una eliminación de amonio mayor. Es el caso de la muestra ML5 (diciembre), la cual operó con TRC= 6,94 d, T^a y pH debajo de la media, y presentó el mayor rendimiento entre las muestras. En relación con el estudio realizado por Munz *et al.* (2011), determinaron que no existía una correlación clara entre la μ_{max} de bacterias nitrificantes con el TRC, pues comparando sus valores encontrados con los de la bibliografía, estos presentaron una gran variabilidad, observando que a TRC mayor de 30 días no representaban mejores resultados. Por otro lado, Wentzel *et al.* (1998) observaron que los valores obtenidos experimentalmente de la biomasa heterótrofa con TRC de 12d eran similares a los teóricos, sin embargo, los encontrados para TRC de 20d no coincidían.

La combinación de elevados TRHds con elevados TRC no favorece al proceso de nitrificación, dado que se relaciona con una mayor concentración de amonio en el efluente, cuando estas dos variables tienden a incrementarse. Esto se debe a que las bacterias nitrificantes al ser estrictamente aerobias experimentan una fase de estrés ambiental al estar sometidas durante un largo período en condiciones anaerobias/anóxicas dentro del decantador secundario. Una vez son recirculadas al reactor biológico, estas tienen una tasa de crecimiento inferior y, sumado al déficit de nutrientes, estas ven disminuido aún más su tasa. Lo anterior explicaría que los valores de μ_{max} encontrados estén por debajo de los valores de referencia. Una mayor biomasa nitrificante no implica una mejor capacidad de nitrificación. Por último, cuando se reducen los sólidos, la $CN-NH_4^+$ será mayor y permitirá una mejor tasa de nitrificación y aumento de la tasa de crecimiento.

Los ensayos respirométricos, tal y como fue comentado en el capítulo 1, son métodos ampliamente usados para determinar los parámetros de las bacterias en los procesos de calibración. Algunos autores han determinado que los resultados obtenidos de estos ensayos están regidos por la relación entre la concentración inicial del sustrato y la concentración inicial de biomasa ($F/M=CM$ o CN).

Choi *et al.* (2006) y Orhon & Okutman (2003) observaron que cuando la relación de CM es baja, el sustrato es rápidamente asimilado y no existe un crecimiento significativo de la biomasa, mientras que, si se dispone de una concentración elevada de sustrato, los microorganismos experimentarán crecimiento celular. En los estudios de Browner *et al.* (1998) y Gatti *et al.* (2010), se ha determinado que, en función del sustrato disponible empleado para llevar a cabo el proceso de catabolismo y/o anabolismo, se pueden presentar variaciones en el rendimiento de las bacterias que se determina experimentalmente. Dicha variación puede ser comprendida teniendo en cuenta la relación sustrato/microorganismos,

pues esta determina si en el consumo de sustrato prevalece el catabolismo o el anabolismo. Lo anterior quiere decir que cuando exista una gran cantidad de sustrato disponible (relación F/M media-alta), entonces predomina el anabolismo y, por lo tanto, los microorganismos tendrán suficiente sustrato para su crecimiento, dominando la multiplicación celular sobre la producción de energía. En cambio, si existe una limitación de sustrato (baja relación F/M), predomina el proceso de catabolismo, dominando la producción de energía para el mantenimiento de las bacterias sobre la multiplicación de microorganismos (Douglas, 2010). Por otro lado, Chudoba *et al.* (1991) encontró que relaciones elevadas de F/M producen un descenso en el rendimiento de las bacterias heterótrofas al aumentar dicha relación.

En el estudio realizado por Douglas (2010) se ha observado que al aumentar la relación sustrato/microorganismos el valor de la constante estequiométrica Y_N también se incrementa. De esta forma, los resultados aquí recogidos apoyan las observaciones de estos autores. Trabajar con elevados SSVLM genera una disminución de la $CN-NH_4^+$, lo que a su vez ocasiona una baja tasa de nitrificación (AUR) cuando los TRC son elevados, seguido finalmente de una baja tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes.

Teniendo en cuenta que la temperatura posee una gran influencia sobre la abundancia de las bacterias nitrificantes, de forma que la tasa de nitrificación aumenta a medida que aumenta la temperatura (Gerardi, 2002), la ausencia de un patrón estacional en este estudio podría ser debida a la operación con un alto TRC durante los períodos más fríos (Zornoza *et al.*, 2012).

5.5 Modelo de interpretación ambiental a partir de las variables de bioindicadores

La abundancia de bioindicadores se encuentra influenciada, de acuerdo a la figura dbRDA, a la variable $SOUR_{end,max}$, encontrándose que una mayoría de organismos se asocian a valores inferiores a $3,5 \text{ gO}_2/\text{gSSVLM.h}$. Estos resultados podrían relacionarse con el hecho de que cuando los SSVLM aumentan, la tasa de nitrificación disminuye y, por lo tanto, lo hace el rendimiento de eliminación de nitrógeno. Los organismos relacionados de forma inversa con altos valores de $SOUR_{end,max}$, parecen estar asociados, sin que exista correlación fuerte, con buenos rendimientos del rNTs. A excepción del grupo de gastrotricos, las demás especies que se relacionan de forma inversa con $SOUR_{end,max}$ presentan dicha relación de abundancia/frecuencia cuando los valores de la tasa de respiración específica disminuyen, lo cual es cierto cuando los SSVLM lo hacen de igual forma.

La dinámica poblacional no responde a las variables ambientales porque se dan condiciones ambientales en rangos muy estrechos, además de las condiciones extremas anteriormente indicadas. Durante el estudio se ha observado un déficit de nitrógeno para siete muestras, mientras que otras tres se encuentran en el límite. Por ello, las bacterias nitrificantes no logran tasas de crecimiento elevadas. Se puede establecer, a partir del porcentaje de $OUR_{end,N}$, que un tercio (33%) de la biomasa que demanda oxígeno en condiciones endógenas corresponde a bacterias nitrificantes. A partir de lo anterior se concluye que, debido a la baja abundancia de bacterias nitrificantes y tasa de crecimiento respecto a las bacterias heterótrofas, junto con el déficit de nitrógeno y fósforo, es posible atribuir que principalmente la eliminación de nitrógeno de la planta es por asimilación.

5.6 Modelo de interpretación ambiental a partir de las variables de nitrógeno del efluente

El modelo DISTLM basado en la relación entre variables respirométricas y nitrógeno del efluente ha representado fehacientemente la relaciones que explican un mejor proceso de nitrificación. Este ha concluido que la variable que mejor representa el rendimiento del nitrógeno es la tasa máxima de crecimiento (μ_{Nmax}). Coherente con los otros modelos el resultado obtenido es el esperado. La correlación entre el r_{NTs} y r_{NKTs} es directa con μ_{Nmax} , mientras que de forma inversa lo hace $N-NH_4^+$. Esto indica que una menor concentración de amonio en el efluente, o lo que es igual, un mejor rendimiento del proceso de nitrificación, involucra una actividad mayor de las bacterias nitrificantes, es decir, una tasa de respiración y tasa de nitrificación más elevadas.

Este resultado se relaciona con el modelo de variables ambientales, donde μ_{Nmax} es mayor cuando el TRC es bajo, lo que corresponde a tener también valores altos de AUR_{max} , los cuales, a su vez, representan una mayor tasa de nitrificación, o lo que es igual un mejor rendimiento. La correlación entre AUR_{max} y r_{NTs} y r_{NKTs} no es representativa, sin embargo, es positiva, lo que indica que un mejor rendimiento está asociado con una mayor tasa de nitrificación. Adicionalmente, se ha visto que valores bajos de $SSVLM$ supone una mayor R_{sp} y, por lo tanto, un incremento en la tasa de nitrificación.

VI.CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

Del presente trabajo se ha podido concluir que:

- El protocolo establecido para ejecutar los ensayos respirométricos permitió medir y comparar correctamente los resultados obtenidos en el estudio, sin presentar diferencias significativas.
- No existe correlación entre la tasa de respiración endógena y exógena. Esto se debe a que, la tasa de respiración endógena se asocia a un estado catabólico, mientras que, en la tasa de respiración exógena, predomina un estado anabólico. Por lo tanto, la OUR_{end} no puede usarse como variable para monitorizar el proceso de nitrificación.
- Un aumento en la tasa específica de consumo de oxígeno máxima causa una reducción en la abundancia de bioindicadores, dado que, el aumento de la tasa específica se relaciona con bajos SSVLM.
- Se ha corroborado que las especies *Arcella* sp. y *Opercularia articulata* son buenos bioindicadores de eliminación de nitrógeno, al estar asociadas a elevados TRC y bajas cargas.
- La especie *Aspidisca cicada* parece estar relacionada con mejores rendimientos de rNKTs.
- La especie *Vorticella aquadulcis* se ha encontrada asociada a valores altos de amonio en el efluente, observación que apoya el resultado obtenido por otros autores.
- La metodología implementada para el cálculo de las variables respirométricas permitió encontrar valores similares a los reportados en otros estudios, como es el caso de μ_{Nmax} , CN y Y_H .
- La tasa de respiración de las bacterias nitrificantes, como la tasa de nitrificación, se ven influenciados por variables como el TRC, los SSVLM y la $CN-NH_4^+$. Observando que, la carencia de sustrato (S_{NH}) contrarresta el efecto positivo del TRC sobre el crecimiento de las bacterias nitrificantes. Encontrando mayores tasas cuando se incrementa el sustrato y se reduce el TRC. Para mejorar el proceso de nitrificación, se recomienda disminuir los SSVLM para aumentar el sustrato y favorecer la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes.
- La estabilidad de los rendimientos de eliminación de nitrógeno estaría asociada a bajos valores de $CN-NH_4^+$ debido a los elevados SSVLM con que opera la planta. Lo cual indicaría que el nitrógeno este siendo eliminado por asimilación para crecimiento celular, de bacterias heterótrofas principalmente, dada su mayor tasa de crecimiento y condiciones favorables del medio.
- El tiempo de retención hidráulico en el reactor favoreció una mayor tasa de nitrificación. Las bacterias nitrificantes se ven favorecidas por las condiciones aerobias, lo cual permite una mayor actividad y tasa de crecimiento.
- El tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario se relacionó con bajas tasas de crecimiento, debido a las condiciones anaerobias y anóxicas que predominan en el sistema, ocasionando estrés ambiental en las bacterias. Se recomienda reducir

el TRHds, empleando el segundo decantador, para favorecer la tasa de crecimiento de bacterias nitrificantes.

- La capacidad de nitrificación y la fracción nitrificante se ven influenciadas negativamente por valores elevados de la carga másica.
- La baja abundancia de bacterias nitrificantes y tasa de crecimiento máximo encontrados, debido al déficit de nutrientes y a las variables ambientales, indican que se deben favorecer las condiciones para que puedan crecer y aumentar la biomasa nitrificante, lo cual favorecería un mejor rendimiento en la eliminación de nitrógeno.
- Las variables que mejor se han ajustado para predecir y monitorizar el rNKTs son la T° , el pH, el TRHr y el TRC, obteniendo un modelo útil con un alto grado de ajuste.

VII.BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

Abraham, J., Butler, R. & Sigee, D., 1997. Ciliate populations and metals in an activated-sludge plant. *Water Research*, Volumen 31, pp. 1103-1111.

Alawi, M. y otros, 2007. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *ISME Journal*, Volumen 1, pp. 256-264.

Al-shahwani, S.M. & Horan, N., 1991. The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants. *Water Research*, Volumen 25, pp. 633-638.

Anderson, M., R.N., G. & Clarke, K., 2008. *PRIMER + for PERMANOVA: Guide to Software and Statistical Methods*. United Kingdom: PRIMER-E. Ltd, Plymouth.

Anderson, M. y R. J., 2003. Generalized discriminant analysis based on distances. *Australian and New Zealand Journal of Statistics*, pp. 301-318.

Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. & Srinath, E. G., 1976. Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid. *Water Pollution Control Federation*, 48(5), pp. 835-852.

Antonietti, R., Broglio, P. & Madoni, P., 1982. The evaluation of biological parameters as indicators of purification efficiency in activated sludge plants. *Ingegneria Ambientale*, Volumen 11, p. 472-477.

Baeza, J., Gabriel, D. & Lafuente, J., 2002. In-line fast OUR (oxygen uptake rate) measurements for monitoring and control of WWTP. *Water Science and Technology*, 45(4-5), p. 19-28.

Baker, L. A., Herlihy, A. T., Kaufmann, P. R. & Eilers, J. M., 1991. Acidic lakes and streams in the United States: the role of acidic deposition. *Science*, p. 1151-1154.

Barnett, V. & Lewis, T., 1984. *Outliers in statistical data*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.

Becharés, E., 1994. *Biología de una planta depuradora de fangos activados de doble etapa tratando aguas residuales de la industria*, León: Tesis. Universidad de León.

Becares, E., Romo, S. & Vega, A., 1994. Organic pollutants and microfauna in an industrial wastewater treatment system. *Verh. Internat. Verein. Limnol*, Volumen 25, p. 2051-2054.

Beckmann, R. J. & Cook, R. D., 1983. Outlier.....s. *Technometrics*, 25(2), pp. 119-149.

Beg, S. A., Siddiqi, R. H. & Ilias, S., 1982. Inhibition of nitrification by arsenic, chromium, and fluoride. *Water Pollution Control Federation*, pp. 482-488.

- Beman, J. M., Popp, B. N. & Francis, C. A., 2008. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME Journal*, 2(4), pp. 429-441.
- Bidstrup, S. & Grady, C., 1988. Simulation of Single Sludge Processes. *J. Wat. Poll. Con. Fed*, Volumen 60, pp. 351-361.
- Blackburne, R., Vadivelu, V., Yuan, Z. & Keller, J., 2007. Determination of growth rate and yield of nitrifying bacteria by measuring carbon dioxide uptake rate. *Water Environment Research*, 79(12), pp. 2437-2445.
- Bock, E., Koops, H. P., Ahlers, B. & Harms, H., 1992. *Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source en The prokaryotes*, s.l.: New York:Springer Verlag, pp. 414-430.
- Bock, E. & Wagner, M., 2006. *Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source*. 2 ed. Springer, New York, NY: The Prokaryotes.
- Bodelier, P., Libochant, J. & Blom, C. L. H., 1996. Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammoniaoxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(11), pp. 4100-4107.
- Bray, J. & Curtis, J., 1957. Ordination of the upland forest community of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, Volumen 27, pp. 325-349.
- Browner, Klapwijk, & Keesman , 1998. Identification of activated sludge and wastewater characteristics using respirometric batch-experiments. *Water Research*, Volumen 32, p. 124-1254.
- Camargo, J. A. & Alonso, Á., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, pp. 831-849.
- Carrera, J., Vicent, T. & Lafuente, J., 2004. Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochemistry*, Volumen 39, p. 2035-2041.
- Carrera, M. J., 2004. *Eliminación biológica en un efluente de alta carga*, Barcelona: Tesis doctoral Universitat Autònoma de Barcelona.
- Catalán, J., 1997. *Depuradoras "Bases Científicas"*, Madrid: Librería Editorial.
- CEC, C. o. t. E. C., 1991. *Directive concerning the collection, treatment and discharge of urban wastewater and the discharge of wastewater from certain industrial sectors*, 91/271/EEC: Official Journal L.
- Čech, J. S., Chudoba, J. & Grau, P., 1985. Determination of Kinetic Constants of Activated Sludge Microorganisms. *Water Science and Technology*, 17(2-3), pp. 259-272.
- Chandola, V., Arindam, B. & Vipin K., 2007. *Outlier detection: A survey*, University of Minnesota: Technical Report Department of Computer Science and Engineering.

- Cheng, S.-S. & Wen-Chin, C., 1994. Organic carbon supplement influencing performance of biological nitrification in a fluidized bed reactor. *Water Science and Technology*, 30(11), pp. 131-142.
- Choi, E., Klapwijk, B., Mels, A. & Browner, H., 2006. Evaluation of wastewater characterization methods. *Water Science and Technology*, Volumen 52, pp. 61-68.
- Chudoba, P., Chevalier, J. J., Chang, J. & Capdeville, B., 1991. Effect of Anaerobic Stabilization of Activated Sludge on its Production under Batch Conditions at Various So/Xo Ratios. *Water Sci Technol*, 23(4-6), pp. 917-926.
- Ciaccio, L. L., 1971. *Water and Water Pollution Handbook*. New York: Marcel Dekker, INC.
- Cingolani, L., Cossignani, M. & Miliani, R., 1991. The role of microfauna in the prediction and control of the activated sludge disfunctions of a municipal plant. *Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current status and perspectives*, Volumen 93-96.
- Cingolani, L., Cossignani, M. & Miliani, R., 1992. Relationships between population dynamics and operating parameters in an activated sludge-plant by statistical analysis. *Water Science and Technology*, 25(4-5), pp. 339-400.
- Clarke, y otros, 2004. *Change in Marine Communities: an Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. Plymouth: PRIMER-E.
- Clarke, K. & Gorley, R., 2015. *PRIMER v7: User Manual/Tutorial*. Plymouth: PRIMER-E.
- Clarke, K., Gorley, R., Somerfield, P. & Warwick, R., 2014. *Change in Marine Communities: an Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. 3er edition ed. Plymouth: PRIMER-E.
- Cohen, J., 1988. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd ed. Hillsdale, NJ: Erlbaum .
- Coop, J. B., Spanjers, H. & Vanrolleghem, P. A., 2002. *Respirometry in Control of the Activated Sludge Process: Benchmarking Control Strategies*. London: IWA Publishing.
- Cossignani, M., Cingolani, L., Giacché, L. & Miliani, R., 1992. Investigations on activated sludge microfauna and treatment plant disfunctions. *Water Science and Technology* , 26(9-11), pp. 2519-2522.
- Crites, R. & Tchobanoglous, G., 1998. *Small and decentralized wastewater management*. New York: McGraw-Hill.
- Curds, C., 1982. The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes. *Annual Review of Microbiology*, Volumen 36, pp. 27-46.
- Curds, C. & Cockburn, A., 1970. Protozoa in biological sewage-treatment processes II. Protozoa as indicators in the activated-sludge process. *Water Research*, Volumen 4, pp. 237-249.

Curds, C., Cockburn, A. & Vandyke, J., 1968. An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated-sludge process. *Wat. Pollut. Cont.*, Volumen 67, pp. 312-329.

Curds, C. R., 1963. The flocculation of suspended matter by *Paramecium caudatum*. *Journal of General Microbiology*, Volumen 33, pp. 357-363.

Daigger, G. & Grady, C., 1998. The dynamics of microbial growth on soluble substrate. *Wat. Res.*, Volumen 16, pp. 365-382.

Daims, H. y otros, 2001. In situ characterization of *Nitrospira* like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, Volumen 67, pp. 5273-5284.

Davies, P. S. & Murdoch, F., 2002. *The role of respirometry in maximising aerobic treatment plant efficiency*, Glasgow: Strathkelvin Instruments Ltd.

Dircks, K., Pind, P. F., Mosbæk, H. & Henze, M., 1999. Yield determination by respirometry - The possible influence of storage under aerobic conditions in activated sludge. *Water SA*, 25(1), pp. 69-74.

Dochain, d., Vanrolleghem, P. & Daele, v. D., 1995. Structural identifiability of biokinetic models of activated sludge respiration. *Water Research*, 29(11), pp. 2571-2578.

Dold, . y otros, 2008. Denitrification with Carbon Addition—Kinetic Considerations. *Water Environment Research*, 80(5), pp. 417-427.

Dold, P., Jones, R. & Bye, C., 2005. Importance and measurement of decay rate when assessing nitrification kinetics. *Water Science & Technology*, 52(10-11), p. 469-477.

Dold, P. & Marais, G., 1986. Evaluation of the Activated Sludge Model proposed by the IAWPRC Task Group. *Wat. Sci. Tech.*, Volumen 18, pp. 63-89.

Douglas, J. E., 2010. *Modelación matemática del proceso de nitrificación en dos etapas. Desarrollo de metodologías de calibración del modelo para un reactor SHARON y un proceso de fangos activados*, Valencia: Memoria de Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia.

Drtil, M., Németh, P. & Bodik, I., 1993. Kinetic constants of nitrification. *Water Research*, 27(1), pp. 35-39.

Dubber, D. & Gray, N., 2009. Enumeration of protozoan ciliates in activated sludge: Determination of replicate number using probability. *Water Research*, Volumen 43, pp. 3443-3452.

Dubber, D. & Gray, N., 2011. The influence of fundamental design parameters on ciliates community structure in Irish activated sludge system. *European Journal of Protistology*, Volumen 47, pp. 274-286.

Effler, S. W., Brooks, C. M., Auer, M. T. & Doerr, S. M., 1990. *Free ammonia and toxicity criteria in a polluted urban lake*, 62, 771-779.: Journal of the Water Pollution Control Federation.

Ekama, G. A., Dold, P. L. & Marais, G. v. R., 1986. Procedures for Determining Influent COD Fractions and the Maximum Specific Growth Rate of Heterotrophs in Activated Sludge Systems. *Water Sci Technol*, 18(6), pp. 91-114.

Ekama, G. & Marais, G., 1984. Two improve sludge settleability parameters. *IMIESA*, 9(6), p. 20.

EPA, E., 1993. *Manual Nitrogen Control.*, Washington: EPA/625/R-93/010.311.

EPA, E., 2006. *Nutrient Control Design Manual: State of Technology Review Report*, Watertown: Cadmus.

Esquivel, R. I. y otros, 2014. A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures. *Biochemical Engineering Journal*, Volumen 83, pp. 70-78.

Esteban, G., Téllez, C. & Bautista, L., 1990. Effects of habitat quality on ciliated protozoa communities in sewage treatment plants. *Environmental Technology* , 12(4), pp. 381-386.

Esteban, G., Téllez, C. & Bautista, L., 1991. Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process. *Water Research*, Volumen 25, pp. 967-972.

Fernández, G. D., Guinea, A. & Serrano, S., 1996. *Guía práctica de identificación de protozoos ciliados en estaciones depuradoras de aguas residuales por lodos activos de la Comunidad Autónoma de Madrid.*, Madrid: s.n.

Ferrer, C., Sanguesa, I. & Bécares E., L. J., 2007. *La depuración en pequeños municipios de Castellón*, Castellón: FACSA y Diputación de Castellón.

Ferrer, P. J. & Seco, T. A., 2007. *Tratamientos biológicos de aguas residuales*. Universidad Politécnica de Valencia: UPV.

Freitag, T. E., Chang, L., Clegg, C. D. & Prosser, J. I., 2005. Influence of Inorganic Nitrogen Management Regime on the Diversity of Nitrite-Oxidizing Bacteria in Agricultural Grassland Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), p. 8323-8334.

Fwetrell, L., 2004. Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environ. Health Perspect*, p. 1371-1374.

Gatti, M., Garcia-Usach, F., Seco, A. & Ferrer, J., 2010. Wastewater COD characterization: analysis of respirometric and physical-chemical methods for determining biodegradable organic matter fractions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volumen 85, p. 536-544.

Gerardi, M. H., 2002. *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*. New York: Wiley-Interscience.

- Grady, L. J., Daigger, G. T., Love, N. G. & Filipe, C. D. M., 2011. *Biological Wastewater Treatment*. London: IWA.
- Graeme, N. W. & Schleper, C., 2006. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle?. *TRENDS in Microbiology*, 14(05), pp. 207-212.
- Grunditz, C. M., Gumaelius, L. & Dalhammar, G., 1998. Comparison of inhibition assays using nitrogen removing bacteria: application to industrial wastewater. *Water Research*, Volumen 32, pp. 2995-3000.
- Guckert, J. B., Carr, G. J., Johnson, T. D. & Burt G. Hamm, D. H. D. Y. K., 1996. Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of Microbiological Methods*, 27(2-3), pp. 183-197.
- Guisasola, A. y otros, 2005. Limitations of ASM1 and ASM3: a comparison based on batch oxygen uptake rate profiles from different full-scale wastewater treatment plants. *Water Science & Technology*, 52(10-11), pp. 69-77.
- Guisasola, C. A., 2005. *Modelling biological organic matter and nutrient removal processes from wastewater using respirometric and titrimetric techniques*, Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; PhD Thesis.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T. & van Loosdrecht, M., 1999. *Activated Sludge Model No. 3*, s.l.: Wat. Sci. Tech.
- Hamann, A., 2016. *Distance-based Redundancy Analysis (db-RDA)*, Edmonton, AB, Canada: University of Alberta.
- Hamm, A., 1964. Untersuchungen über die Ökologie und Variabilität von *Aspidisca costata* (Hypotricha) in Belebtschlamm. *Archiv für Hydrobiologie*, Volumen 60, pp. 268-339.
- Harremoës, H., Winther, N. M. & Thirsing, C., 1998. Six years of pilot plant studies for design of treatment plants for nutrient removal. *Water Science and Technology*, Volumen 38, pp. 219-226.
- Hawkins, D. M., 1980. *Identification of Outliers*. London: Chapman & Hall.
- Hellinga, C. y otros, 1998. The sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Science and Technology*, 37(9), pp. 135-142.
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J. & Arvin, E., 2002. Wastewater Treatment. En: *Biological and Chemical Processes*. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 422.
- Henze, M., Harremoës, P. & la Cour Jansen, J., E., 1997. *Wastewater Treatment*. Berlin: Springer-Verlag.
- Henze, M. y otros, 2000. *Activated sludge models: ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3d*, London, UK: IWA Scientific and Technical Reports No. 9.

Henze, M. y otros, 1995. *Activated Sludge Model No. 2*, London: IAWQ Scientific and Technical Report No. 3, IAWQ.

Herve, A. & Lynne, J. W., 2010. Principal component analysis. *Comp Stat*, p. 433-459.

Hockenbury, M. R. & Grady, L. C. J., 1977a. Inhibition of Nitrification-Effects of Selected Organic Compounds. *Water Pollution Control Federation*, 49(5), pp. 768-777.

Hockenbury, M. R., Grady, P. L. & Daigger, G. T., 1977b. Factors Affecting Nitrification. *Journal of the Environmental Engineering Division*, 103(1), pp. 9-19.

Holland, S. M., 2008. *Non-metric multidimensional scaling*, Athens, GA : Department of Geology, University of Georgia.

Holloche, T. C., Tate, M. E. & Nicholas, D. J. D., 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Biological Chemistry*, 256(21), pp. 10834-10836.

Hoque, M. & Aravinthan, V., 2010. Calibration of biokinetic model for acetate biodegradation using combined respirometric and titrimetric measurements. *Bioresource Technology*, Volumen 101, p. 1426-1434.

Hotelling, H., 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *British Journal of Educational Psychology*, pp. 417-441.

Hu, B. y otros, 2013. Dynamics of the microfauna community in a full-scale municipal wastewater treatment plant experiencing sludge bulking. *Journal of Environmental Sciences*, 25(7), pp. 1379-1385.

Hu, B., Qi, R., An, W. & Yang, M., 2012. Responses of protists different feeding habits to the changes of activated sludge conditions: A study based on biomass data. *Journal of environmental Sciences* , Volumen 24(12), pp. 2127-2132.

Isac, I. y otros, 2005. *Álbum fotográfico de microorganismos presentes en fangos activos*, Sevilla: Tecnología del agua.

Ismail, A., 2008. *Determination Of The Heterotrophic And Autotrophic Active Biomass During Activated Sludge Respirometric Batch Assays Using Molecular Techniques*, Thesis for Doctoral Degree: Durban University of Technology.

James, F. & McCulloch, C., 1990. Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or pandora's box?. *Annual Review of Ecology and Systematics*, pp. 129-166.

Jaromin-Glen, K., Babko, R., Łagód, G. & Sobczuk, H., 2013. Community composition and abundance of protozoa under different concentration of nitrogen compounds at "Hajdow" wastewater treatment plant. *Ecological Chemistry and Engineering S*, Volumen 20, pp. 127-139.

Jianlong, W. & Ning, Y., 2004. Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions. *Process Biochemistry*, Volumen 39, p. 1223-1229.

Jubany, G. I., 2007. *Operation, modeling, and automatic control of complete and partial nitrification of highly concentrated ammonium wastewater*, Bellaterra: Universidad Autònoma de Barcelona, PhD Thesis.

Jubany, I., Baeza, J., Carrera, J. & Lafuente, J., 2004. *Modelling biological nitrite oxidation including biomass growth and substrate inhibition using only oxygen uptake rate measurements*. Marrakech (Marocco), In: Proceedings 4th IWA World Water Congress and Exhibition..

Jubany, I., Carrera, J. & Lafuente, J., 2008. Start-up of a nitrification system with automatic control to treat highly concentrated ammonium wastewater: Experimental results and modeling. *Start-up of a nitrification system with automatic control to treat highly concentrated ammonium wastewater: Experimental results and modeling*, Volumen 144, p. 407-419.

Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A. & Wagner, M., 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Systematic and Applied Microbiology*, Volumen 25, pp. 84-99.

Kappeler, J. & Gujer, W., 1992. Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Wal. Sci. Tech.*, 25(6), pp. 125-139.

Kim, D.-J., Lee, D.-I. & Keller, J., 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology*, p. 459-468.

Kim, J.-H., Guo, X. & Park, H.-S., 2008. Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation. *Process Biochemistry*, p. 154-160.

Knobelsdorf, M. M. J., 2005. *Eliminaci3n biol3gica de nutrientes en un ARU de baja carga org3nica mediante el proceso VIP*, Barcelona: Universidad Polit3cnica de Catalu1a, Tesis doctoral.

Kong, Z., Vanrolleghem, P., Willems, P. & Verstraete, W., 1996. Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxidation and nitrification with a respirometer. *Water Research*, 30(4), pp. 825-836.

Lee, S., Basu, S., Tyler, C. & Wei, I., 2004. Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island treatment plant. *Advances in Environmental Research*, Volumen 8, pp. 371-378.

Limpiyakorn, T., Sonthinphand, P., Rongsayamanot, C. & Polprasert, C., 2011. Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, Volumen 102, pp. 3694-3701.

Liu, G., 2012. *Nitrification performance of activated sludge under low dissolved oxygen conditions*, s.l.: Missouri University of Science and Technology.

- Liu, G. & Wang, J., 2012. Probing the stoichiometry of the nitrification process using the respirometric approach. *Water Research*, Volumen 46, pp. 5954-5962.
- Liwerska-Bizukojc, E. & Bizukojc, M., 2012. A new approach to determine the kinetic parameters for nitrifying microorganisms in the activated sludge systems. *Bioresource Technology*, Volumen 109, pp. 21-25.
- López, E. & Hidalgo, R., 2010. Escalamiento Multidimensional No Métrico. Un ejemplo con R empleando el algoritmo SMACOF. *Estudios sobre educación*, pp. 9-35.
- Madoni, P., 1988. *I protozoi ciliate nel controllo di efficienza dei fanghi attivi*, Reggio Emilia: Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale.
- Madoni, P., 1991. Role of protozoans and their indicator value in the activated sludge. *Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives.*, pp. 21-27.
- Madoni, P., Davoli, D. & Chierici, E., 1993. Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *Water Research*, Volumen 27, pp. 1485-1491.
- Madoni, P., 1994. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Research*, Volumen 28, pp. 67-75.
- Manga, C. J. G., 2000. *Desarrollo de un modelo general para la eliminación biológica de nutrientes en los sistemas de fangos activados. una modificación al modelo no.2 de la iwa que incluye la competición entre las bacterias PAO y GAO*, Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Manser, R., Gujer, W. & Siegrist, H., 2006. Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems. *Water Research*, 40(12), pp. 2416-2426.
- Manser, R., Muche, K., Gujer, W. & Siegrist, H., 2005. *Bioaugmentation of nitrifying bacteria en Population Dynamics and Kinetics of Nitrifying Bacteria in membrane and conventional sludge plants*, Zurich: Swiss Federal Institute of Technology Zurich.
- Mara, D. & Horan, N. J., 2003. *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. London: Academic Press.
- Martín, C. M., Serrano, S. & Guinea, A., 1995. Occurrence of *Acineria uncinata* in activated sludge plants: morphology and relationship with physico-chemical parameters. *Archiv für Protistenkunde*, Volumen 146, pp. 79-84.
- McArdle, B. & Anderson, M., 2001. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology*, Volumen 82, pp. 290-297.
- McCarty, P. L., Bae, J. & Kim, J., 2011. Domestic Wastewater Treatment as a Net Energy Producer Can This be Achieved?. *Environmental Science & Technology*, Volumen 45, p. 7100-7106.

Melcer, H., 2004. *Methods for Wastewater Characterization in Activated Sludge Modelling*. London: IWA Publishing.

Moeller, G. & T. A., 2010. Microbiologia de lodos activados. *Journal of Chemical Information and Modeling*, pp. 148-208.

Munz, G., Lubello, C. & Oleszkiewicz, J. A., 2011. Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria. *Chemosphere*, p. 720-725.

Mußmann, M. y otros, 2011. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), pp. 16771-16776.

Oliveira, C. S. y otros, 2011. In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities. *Biochemical Engineering Journal*, pp. 12-19.

Olson, T. C. & Hooper, A. B., 1983. Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: an extracytoplasmic dehydrogenase in Nitrosomonas. *FEMS Microbiology Letters* 19: 47-50. *FEMS Microbiology Letters*, 19(1), pp. 47-50.

Ordaz, A. y otros, 2011. Determination of apparent kinetic and stoichiometric parameters in a nitrifying fixed-bed reactor by in situ pulse respirometry. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), pp. 123-130.

Orhon, D., Genceli, E. A. & Sözen, S., 2000. Experimental evaluation of the nitrification kinetics for tannery wastewaters. *Water SA*, p. 43.

Orhon, D. & Okutman, D., 2003. Respirometric assessment of residual organic matter for domestic wastewaters. *Enzyme Microbiology Technology*, Volumen 32, p. 560-566.

Oslislo, A. & Lewandowski, Z., 1985. Inhibition of nitrification in the packed bed reactors by selected organic compounds. *Water Research*, pp. 423-426.

Papadimitriou, C., Palaska, G. S., P., L. M. & Sakellariopoulos, G., 2004. *The relation of protozoan populations to activated sludge performance*, Mykonos: Protection and Restoration of the Environment VII.

Park, H.-D. & Noguera, D. R., 2004. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Research*, pp. 3275-3286.

Pérez-Uz, B. y otros, 2010. Assessment of advanced wastewater treatments for nitrogen removal searching for plausible efficiency bioindicators. *Water Research*, Volumen 44, pp. 5059-5069.

Petersen, B., Gernaey, K., Henze, M. & Vanrolleghem, P. A., 2002. Evaluation of an ASM1 model calibration procedure on a municipal-industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hydroinformatics*, Volumen 04.1, pp. 15-38.

Pirt, S. & Bazin, M. J., 1972. Possible Adverse Effect of Protozoa on Effluent Purification Systems. *Nature*, Volumen 290, p. 239.

Poole, J., 1984. A study of the relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works. *Water Research*, Volumen 18, pp. 281-187.

Prando, R. R., 1996. *Manual de la Gestión de la Calidad Ambiental*, Montevideo: Piedra Santa S.A.

Qian, W. y otros, 2017. The inhibitory effects of free ammonia on ammonia oxidizing bacteria and nitrite oxidizing bacteria under anaerobic condition. *Bioresource Technology*, Volumen 243, pp. 1247-1250.

Quintela, M. & Ro, K., 2003. Atmospheric oxygen transfer during in situ oxygen uptake rate measurements. *J. Env. Eng.*, 129(2), pp. 183-186.

Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, Volumen 62, pp. 142-160.

Randall, C. W., Barnard, J. L. & Stensel, D. H., 1998. *Design and Retrofit of Wastewater Treatment Plants for Biological nutrient removal*. Lancaster(Pensylvania): Technomic Publishing Company.

Ríos, G. A., 2017. *Técnicas estadísticas en análisis de redes sociales*, Sevilla: Universidad de Sevilla.

Rittmann, B. E. & McCarty, P., 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. Boston: McGraw-Hill.

Rius, M., 2003. Caracterización del proceso de depuración de aguas residuales y dinámica de las comunidades de microorganismos en plantas SBR. *Tesis Doctoral*.

Russo, R., 1985. Ammonia, nitrite and nitrate. In: Rand GM, Petrocelli SR, editors. Washington DC: Hemisphere Publishing Corporation.

Sakhraoui, M., Zerdazi, Z. R., Lehocine, B. & Meniai, A.-H., 2017. Respirometric evaluation of SO/XO ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, pp. 12933-12942.

Salem, S., Moussa, M. & Loosdrecht, M. v., 2006. Determination of the Decay Rate of Nitrifying Bacteria. *Wiley InterScience*, pp. 251-262.

Salvadó, H., 1994. Effect of mean cellular retention time on ciliated protozoan populations in urban wastewater treatment plants based on a proposed model. *Water Research*, Volumen 28, pp. 1315-1321.

Salvadó, H. & García, M., 1993. Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoa analysis. *Wat. Res.*, Volumen 27, pp. 891-895.

- Salvadó, H. G. M. y. A. J., 1995. Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. *Water Research*, Volumen 29, pp. 1041-1050.
- Santos, L., Ferreira, V., Pereira, M. & Nicolau, A., 2014. Relationship between protozoan and metazoan communities and operation and performance parameters in a textile sewage activated sludge system. *European Journal of Protistology*: , 50(4), pp. 319-318.
- Schindler, D. W., 1988. Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science*, pp. 149-157.
- Schleper, C., Jurgens, G. & Jonscheit, M., 2005. Genomic studies of uncultivated Archaea. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(6), pp. 479-88.
- Schramm, A. d. B. D. v. d. H. J. O. S. y. A. R., 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology*, Volumen 65, pp. 3690-3696.
- Schwaab, M. & Pinto, J. C., 2007. Optimum reference temperature for reparameterization of the Arrhenius equation. Part 1: Problems involving one kinetic constant. *Chemical Engineering Science*, Volumen 62, p. 2750 - 2764.
- Seviour, R. J. & Nielsen, . P. H., 2010a. *Microbial ecology of activated sludge*. London: IWA Publishing.
- Seviour, R. J. & Nielsen, P. H., 2010. Microbial communities in activated sludge en *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing, pp. 95-125.
- Shammas, N. K., 1986. Interactions of Temperature, pH, and Biomass on the Nitrification Process. *Water Pollution Control Federation*, 58(1), pp. 52-59.
- Sinha, B. & Annachatre, A. P., 2007. Partial nitrification-operational parameters and microorganisms involved. *Environ Sci Biotechnol*, p. 285-313.
- Smith, V., Tilman, G. & Nekola, J., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, pp. 179-196.
- Spang, A. y otros, 2010. Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. 6(12), pp. 2245-56.
- Spanjers, H. & Vanrolleghem , P., 1995. Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Sci. Technol*, 31(2), p. 105-114.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P., Olsson, G. & Dold, P., 1996. Respirometry in Control of the Activated Sludge Process. *Wat. Sci. Tech.*, 34(3-4), pp. 117-126.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P., Olsson, G. & Dold, P., 1998. *Respirometry in control of the activated sludge process: Principles*, Bristol: IAWQ.

- Stark, J. M., 1996. Modeling the temperature response of nitrification. *Biogeochemistry*, pp. 433-445.
- Stenstrom, M. K. & Poduska, R. A., 1980. The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Water Research*, Volumen 14, pp. 643-649.
- Strotmann, U., A. Geldem, A. K., Gcndig, C. & Klein, S., 1999. Evaluation of a respirometric test method to determine the heterotrophic yield coefficient of activated sludge bacteria. *Chemosphere*, Volumen 38, pp. 3555-3510.
- SURCIS, 2003. *Guía de aplicación de respirometría en analizadores BM*, Barcelona: SURCIS.
- Surmacz-Gorska, J. y otros, 1996. Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Research*, 30(5), pp. 1228-1236.
- Tchobanoglous, G. & Burton, F., 1995. *Metcalf & Eddy : Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y Reutilización*. 3 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. & Stensel, H., 2003. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*. 4 ed. New York: McGraw-Hill, Inc.: Metcalf & Eddy, Inc.'s.
- Tokutomi, T., 2004. Operation of a nitrite-type airlift reactor at low DO concentration.. *Water Sci Technol*, 49(5-6)), p. 81-88.
- Trapani, D. D. y otros, 2011. Evaluation of biomass activity and wastewater characterization in a UCT-MBR pilot plant by means of respirometric techniques. *Desalination*, 269(1-3), pp. 190-197.
- Vanrolleghem, P. A., 2002. *Principles of Respirometry in Activated Sludge Wastewater Treatment*, Belgium: Universiteit Gent, Department of Applied Mathematics Biometrics and Process Control.
- Vanrolleghem, P., Kong, Z., Rombouts, G. & Verstraete, W., 1994. An on-line respirographic biosensor for the characterization of load and toxicity of wastewaters. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, Volumen 59, pp. 321-333.
- Vasco, M. J., Mas, M. & Salvadó, H., 2009. Caracterización de los microorganismos de depuradoras biológicas urbanas de fangos activos con tratamiento convencional y de eliminación de nutrientes. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 29(305), pp. 68-78.
- Wang, L. K., Shammas, N. K. & Hung, Y.-T., 2009. *Advanced Biological Advanced Biological*. New York: Humana Press.
- Watson, S. W. & Mandel, M., 1976. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *Journal of Bacteriology*, 107(02), pp. p. 563-569.

Wells, G. F. y otros, 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. pp. 2310-2328.

Wentzel, M. C., Ekama, G. A. & Marais, G. v. R., 1991. Kinetics of Nitrification Denitrification Biological Excess Phosphorus Removal Systems-A Review. *Water Science and Technology*, 23(4-6), pp. 555-565.

Wentzel, M., Ekama, G. & Marais, G., 1992. *Processes and modeling of nitrification denitrification biological excess phosphorus removal systems- a review*, s.l.: Wat. Sci. Tech..

Wentzel, M., Ubisi, M. & Ekama, G., 1998. Heterotrophic active biomass component of activated sludge mixed liquor. *Wat. Sci. Tech.* , 37(4-5), pp. 79-87.

Werzernak, C. T. & Gannon, J. J., 1967. *Oxygen-nitrogen relationships in autotrophic nitrification*, American Society for Microbiology: Applied Microbiology, 15(5), 1211-1215. .

Wezernak, C. T. & Gannon, . J. J., 1967. Oxygen-Nitrogen Relationships in Autotrophic Nitrification. *Microbiology*, pp. 1211-1215.

Wicks, M. A., 1998. *Introductory Statistics for the Social Sciences*, Regina: Department of Sociology and Social Studies, University of Regina.

Wolfe, A. y. P. J., 2002. Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Ambio*, 31(2), pp. 120-125.

Young, J. C. & Cowan, R. M., 2004. *Respirometry for Environmental Science and Engineering*. Springdale, Arkansas USA: SJ Enterprises.

You, S.-J., Tsai, Y.-P. & Huang, R.-Y., 2008. Effect of heavy metals on nitrification performance in different activated sludge processes. *Journal of Hazardous Materials*, pp. 987-994.

Zhou, K., Xu, M., Liu, B. & Cao, H., 2008. Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. *Journal of Environmental Sciences* , Volumen 20, pp. 482-486.

Zornoza, A. y otros, 2012. Análisis de las correlaciones entre parámetros operacionales y fisicoquímicos relacionados con el proceso biológico de nitrificación en fangos activos. *Tecnología del Agua* , Volumen 37, pp. 22-34.

Zornoza, Z. A. M., 2017. *Estudio de la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas y su interpretación ecológica en fangos activos*, Valencia: Memoria título de Doctor de la Universitat Politècnica de Valencia.

VIII.ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo 1

Tabla 8.1 Matriz variables operacionales

Ensayo	CM (DBO)	TRHr	TRHds	TRC	OD
N°	kgDBO/kgSSV.d	h	h	d	mg/l
ML1	0,149	21,44	14,67	10,90	2,00
ML2	0,167	19,45	13,31	11,14	2,00
ML3	0,120	22,38	15,31	9,25	2,00
ML4	0,255	14,75	10,10	7,51	2,00
ML5	0,154	20,88	14,29	6,94	2,00
ML6	0,126	19,55	13,38	6,21	2,00
ML7	0,339	12,73	8,71	6,05	2,00
ML8	0,215	18,15	12,42	10,74	2,00
ML9	0,117	17,49	11,97	8,85	2,00
ML10	0,064	20,28	13,88	11,79	2,00
ML11	0,166	19,67	13,46	16,49	2,00
ML12	0,107	19,72	13,49	15,97	2,00
ML13	0,183	19,79	13,54	13,81	2,00
ML14	0,176	16,33	11,18	12,16	2,00
ML15	0,075	19,20	13,14	17,22	2,00
ML16	0,204	19,55	13,38	15,82	2,00
ML17	0,157	17,41	11,92	12,71	2,00
ML18	0,194	19,81	13,36	12,53	2,00
ML19	0,086	18,38	13,56	12,50	2,00
ML20	0,199	17,83	13,31	6,14	2,00
ML21	0,195	11,53	12,58	6,97	2,00
ML22	0,202	11,53	12,20	23,55	2,00

Anexo 2

Tabla 8.2 Matriz de variables fisicoquímicas y nutrientes del afluente al reactor

Ensayo	T°	pH	SSVLM	DQO	DBO	NKTs	N-NH ₄ ⁺	CN-NH ₄ ⁺	P-PO ₄	CP-PO ₄	DBO ₅ /P-PO ₄	DBO ₅ /N-NH ₄ ⁺
N°	°C	-	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	gN-NH ₄ /kgSSVLM.d	mg/l	gP-PO ₄ /kgSSVLM.d	mg/mg	mg/mg
ML1	24,1	7,18	6619	1132	900	69,50	60,20	10,00	6,30	1,33	141,96	14,95
ML2	23,4	7,28	6466	1110	875	73,00	61,80	11,79	5,70	1,36	154,32	14,16
ML3	24,1	7,10	7258	1071	850	62,20	35,20	4,99	6,40	1,18	133,65	24,15
ML4	21,2	7,10	4980	1021	800	61,90	53,50	17,08	6,00	2,45	132,89	14,95
ML5	19,6	7,12	4990	1050	680	60,30	42,10	9,51	5,70	1,64	119,09	16,15
ML6	19,1	7,10	4752	1081	502	61,20	49,50	12,43	5,30	1,71	94,90	10,14
ML7	17,9	7,01	4879	1109	877	51,30	29,50	11,42	4,00	1,93	219,80	29,73
ML8	20,0	7,14	4908	1084	810	68,10	66,90	17,73	7,50	2,53	107,57	12,11
ML9	17,3	7,01	6565	911	580	47,60	34,20	6,93	1,40	0,37	414,29	16,96
ML10	18,6	7,01	6130	750	342	48,00	31,30	5,87	5,30	1,28	65,02	10,93
ML11	19,0	7,06	5855	1020	780	50,20	32,50	6,91	5,60	1,46	139,29	24,00
ML12	19,2	7,50	5460	840	494	42,50	29,60	6,38	5,10	1,42	96,48	16,69
ML13	20,4	7,32	4940	943	700	66,50	56,50	14,76	5,20	1,60	135,14	12,39
ML14	19,0	7,15	4680	929	563	61,20	49,50	15,46	3,50	1,37	159,49	11,37
ML15	19,1	7,26	4274	549	256	55,00	48,60	14,25	6,00	2,19	42,81	5,27
ML16	21,2	7,21	4619	1127	750	55,40	46,90	12,74	7,60	2,52	98,81	15,99
ML17	21,4	7,28	4829	843	550	54,90	31,70	9,05	5,00	1,78	111,11	17,35
ML18	22,7	7,27	5170	1143	816	46,30	36,00	8,56	4,70	1,40	172,88	22,67
ML19	22,3	7,20	4371	473	322	58,20	53,60	14,25	5,00	1,73	64,02	6,01
ML20	23,7	7,20	4571	1009	750	56,40	45,20	12,01	5,00	1,69	150,60	16,59
ML21	23,7	7,23	4558	1133	698	45,20	31,60	8,84	3,70	1,32	188,65	22,09
ML22	25,8	7,30	4279	913	700	43,70	27,60	7,98	4,00	1,57	176,32	25,36

Anexo 3

Tabla 8.3 Matriz variables de nitrógeno efluente y rendimientos

Ensayo	NTs	NKTs	N-NH₄⁺	N-NO₂⁻	N-NO₃⁻	rNKTs	rNTs
N°	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	%	%
ML1	9,80	8,80	6,98	0,04	0,96	87,34	85,90
ML2	8,95	5,98	3,70	0,12	2,85	91,81	87,74
ML3	13,00	6,89	10,60	0,10	1,21	88,92	86,82
ML4	12,50	8,73	9,81	2,53	1,24	85,90	79,81
ML5	2,60	1,02	1,30	0,08	1,50	98,31	95,69
ML6	7,95	2,95	1,02	2,10	2,90	95,18	87,01
ML7	6,10	3,40	4,20	0,80	1,90	93,37	88,11
ML8	10,20	4,33	2,04	1,63	4,24	93,64	85,02
ML9	5,60	2,32	0,75	0,43	2,85	95,13	88,24
ML10	10,80	4,69	4,36	0,75	5,36	90,23	77,50
ML11	13,60	5,12	3,66	0,80	7,68	89,80	72,91
ML12	8,80	1,75	1,50	0,25	6,80	95,88	79,29
ML13	9,50	4,58	3,01	0,12	4,80	93,11	85,71
ML14	9,82	5,97	2,06	0,85	3,00	90,25	83,95
ML15	11,80	5,45	1,99	0,29	6,06	90,10	78,55
ML16	8,85	3,20	0,16	0,25	5,40	94,22	84,03
ML17	9,49	3,97	1,82	0,63	4,89	92,76	82,71
ML18	11,00	1,81	0,52	0,35	8,84	96,10	76,24
ML19	11,70	5,10	1,89	0,50	6,10	91,24	79,90
ML20	11,50	3,09	1,00	0,52	7,89	94,52	79,61
ML21	9,82	3,79	2,08	0,78	5,25	91,61	78,27
ML22	6,80	2,40	0,39	0,61	3,79	94,51	84,44

Anexo 4

Tabla 8.4 Matriz de bioindicadores

Nombre	Abreviatura	ML1	ML2	ML3	ML4	ML6	ML7	ML8	ML9	ML10	ML11	ML12	ML13	ML14	ML15	ML16	ML17	ML18	ML19	ML20	ML21	ML22
Aspidisca cicada	Acica	80	120	40	0	3880	1560	240	40	240	200	360	280	800	360	4760	680	2400	40	0	560	160
Acineta sp.	Acin	40	680	400	80	240	520	80	280	360	120	160	240	760	200	200	240	240	40	0	0	80
Amebas desnudas	Ades	4160	3440	2560	7280	6120	5680	6200	3600	3240	2560	2640	1560	4000	1640	2120	4400	3480	2880	5320	7120	4200
Amphileptus punctatus	Apun	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	80	0	0	0	80	0	0	0	40
Amphileptus punctatus	Apunc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	120	0	0	0
Arcella sp.	Arce	360	1440	7960	320	1640	0	840	920	1920	3200	9760	20400	7600	120	0	80	0	0	0	0	1000
Acinertia uncinata	Auncin	40	80	0	0	1200	320	520	80	440	2840	1280	80	0	40	40	0	120	80	0	400	40
Centropyxis sp.	Centro	760	1440	880	640	120	80	360	40	0	0	40	80	160	120	160	80	0	0	0	0	0
Carchesium polypinum	Cpoly	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	0	0	0
Euplotes affinis	Eaffin	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0
Epistylis balatonica	Ebala	1073	147	0	400	0	87	460	547	113	0	0	0	0	0	0	780	5640	0	0	580	0
Entosiphon sp.	Ento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1960	2640	40	0	0	0	0
Euplotes patella	Epatel	0	0	0	40	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0
Epistylis plicatilis	Eplica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
Euglypha sp.	Eugly	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrotricos	Gastro	680	3120	3800	1200	0	0	0	40	80	200	440	1120	2320	440	0	0	40	0	0	280	0
Holophrya sp.	Holo	80	0	0	200	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	80	40	240	160	160	40	0
Lecane sp.	Leca	760	1520	560	320	40	40	0	0	40	40	40	360	680	1120	200	160	400	520	760	1520	920
Litonotus lamella	Llam	0	0	160	40	80	160	360	280	40	560	520	480	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nematodo	Nemato	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0
Opercularia articulata	Oarti	0	0	0	0	0	0	13	967	3013	3900	12307	14407	15807	5560	0	73	40	260	313	313	0
Paramecium sp.	Param	0	0	0	0	120	200	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Peranema sp.	Pera	80	640	80	600	0	40	280	440	1640	800	0	80	280	1520	40	40	80	40	40	0	120
Pseudochilodonopsis fluviatilis	Pfluvi	80	0	0	0	200	0	400	120	640	160	0	160	0	0	240	40	40	240	0	0	0
Plagiocampa	Plagio	960	880	200	0	0	80	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
Rotaria sp.	Rota	0	0	80	160	80	40	120	40	0	0	80	40	0	240	80	240	200	40	120	240	40
Stichotricha sp	Sticho	240	240	400	560	1440	640	1120	200	360	120	160	40	120	160	80	0	240	760	280	720	40
Tokophrya infusionum	Tinfu	0	0	0	0	0	120	80	440	80	80	0	40	0	0	0	0	0	0	0	40	0
Trochilia minuta	Tminu	2280	2240	1000	4840	400	160	2080	5040	5360	40	0	200	2280	1080	80	40	4080	0	0	160	0
Uronema nigricans	Unigri	0	0	0	0	10320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1160	1320	600	960	120	440	160
Vorticella aquadulcis	Vaqua	400	4000	14280	15680	4720	5720	6400	7520	3080	40	0	0	40	0	80	3920	720	120	0	1440	40
Vorticella convallaria	Vconva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vorticella microstoma	Vmicro	0	0	0	0	0	0	0	0	40	360	320	80	40	2200	120	120	120	0	80	800	160

Valor atípico en amarillo

Anexo 5

Tabla 8.5 Matriz de variables respirométricas

Ensayo	OURend.max	SOURend.max	OURend.H	SOURH	OURend.N	SOURN	RsN	Rsp	AUR'	AUR	AURmax	RsH
N°	mgO ₂ /lh	mgO ₂ /gh	mgO ₂ /lh	mgO ₂ /gh	mgO ₂ /lh	mgO ₂ /gh	mgO ₂ /lh	mgO ₂ /gh		mgN-NH ₄ '/lh		mgO ₂ /lh
ML1	21,74	3,28	14,69	2,22	7,05	1,06	26,04	3,93	5,70	4,56	5,94	
ML2	20,68	3,20	17,39	2,69	3,29	0,51	33,22	5,14	7,27	5,82	7,85	
ML3	27,60	3,80	20,25	2,79	7,35	1,01	19,76	2,72	4,32	3,46	4,51	
ML4	16,52	3,32	14,10	2,83	2,42	0,49	19,56	3,93	4,28	3,42	5,19	
ML5	13,92	2,79	10,78	2,16	3,14	0,63	24,76	4,96	5,42	4,33	7,21	
ML6	14,16	2,98	10,56	2,22	3,60	0,76	38,32	8,06	8,39	6,71	11,51	41,32
ML7	15,72	3,22	11,90	2,44	3,82	0,78	53,30	10,92	11,66	9,33	17,32	54,33
ML8	12,60	2,57	8,86	1,81	3,74	0,76	21,56	4,39	4,72	3,77	6,13	52,92
ML9	17,96	2,74	12,48	1,90	5,48	0,83	19,46	2,96	4,26	3,41	6,59	
ML10	14,16	2,31	9,32	1,52	4,84	0,79	36,82	6,01	8,06	6,45	11,42	60,76
ML11	16,17	2,76	11,14	1,90	5,03	0,86	28,47	4,86	6,23	4,98	8,60	53,28
ML12	18,73	3,43	13,98	2,56	4,75	0,87	17,93	3,28	3,92	3,14	5,35	49,40
ML13	25,32	5,13	17,14	3,47	8,18	1,66	20,66	4,18	4,52	3,62	5,73	68,22
ML14	18,64	3,98	11,85	2,53	6,79	1,45	10,56	2,26	2,31	1,85	3,19	45,80
ML15	13,98	3,27	9,21	2,16	4,77	1,12	47,60	11,14	10,42	8,33	14,30	54,72
ML16	27,32	5,91	8,13	1,76	19,19	4,15	42,86	9,28	9,38	7,50	11,37	38,92
ML17	22,84	4,73	13,60	2,82	9,24	1,91	22,52	4,66	4,93	3,94	5,91	54,24
ML18	22,98	4,44	12,30	2,38	10,68	2,06	24,00	4,64	5,25	4,20	5,87	39,58
ML19	15,06	3,45	11,15	2,55	3,91	0,90	34,36	7,86	7,52	6,01	8,58	30,24
ML20	17,18	3,76	12,98	2,84	4,20	0,92	17,06	3,73	3,73	2,99	3,97	17,36
ML21	17,84	3,91	13,21	2,90	4,63	1,02	14,36	3,15	3,14	2,51	3,34	40,80
ML22	21,36	4,99	10,92	2,55	10,44	2,44	4,20	0,98	0,92	0,74	0,92	37,12

Anexo 6

Tabla 8.6 Parámetros cinéticos, estequiométricos y variables de control

Ensayo	$Y_{N,SSV}$	Y_{N,O_2}	X_N	μ_N	μ_{Nmax}	b_N	F_N	Y_H	b_H	X_H	C_N	T_N	TRC_N
N°	mgSSV/mgN	mgDQO/mgN	mg/l	d ⁻¹	d ⁻¹	d ⁻¹	-		d ⁻¹	mg/l	mg/lh	h	d
ML1	0,18	0,26	218,20	0,09	0,12	0,19	0,03		0,28	881,09	78,19	13,21	5,89
ML2	0,18	0,26	279,90	0,09	0,12	0,19	0,03		0,27	1071,58	90,49	10,63	5,82
ML3	0,18	0,26	138,21	0,11	0,14	0,19	0,03		0,28	1214,22	61,93	10,18	4,99
ML4	0,18	0,26	111,06	0,13	0,20	0,18	0,03		0,25	947,53	40,41	15,62	3,49
ML5	0,18	0,26	129,92	0,14	0,24	0,17	0,03		0,24	771,04	72,41	9,71	2,94
ML6	0,18	0,26	179,89	0,16	0,28	0,17	0,03	0,15	0,23	770,65	104,93	7,38	2,55
ML7	0,18	0,26	243,79	0,17	0,31	0,16	0,03	0,51	0,22	910,34	95,01	3,16	2,29
ML8	0,18	0,26	175,14	0,09	0,15	0,17	0,03	0,50	0,24	624,21	54,80	17,73	4,66
ML9	0,18	0,26	130,24	0,11	0,22	0,16	0,03		0,22	977,05	47,66	10,04	3,22
ML10	0,18	0,26	328,31	0,08	0,15	0,16	0,04	0,40	0,23	693,21	104,55	4,86	4,69
ML11	0,18	0,26	355,00	0,06	0,10	0,17	0,03	0,65	0,23	815,89	78,43	6,52	6,73
ML12	0,18	0,26	216,52	0,06	0,11	0,17	0,03	0,63	0,23	1015,89	49,51	9,43	6,60
ML13	0,18	0,26	215,81	0,07	0,11	0,17	0,03	0,46	0,24	1188,25	57,26	15,62	6,14
ML14	0,18	0,26	97,07	0,08	0,14	0,17	0,03	0,50	0,23	867,87	24,15	26,78	4,96
ML15	0,18	0,26	619,84	0,06	0,10	0,17	0,05	0,41	0,23	671,93	127,97	5,83	7,07
ML16	0,18	0,26	512,67	0,06	0,10	0,18	0,03	0,71	0,25	546,18	117,35	6,25	7,35
ML17	0,18	0,26	216,41	0,08	0,12	0,18	0,03	0,61	0,25	906,79	54,91	8,04	5,97
ML18	0,18	0,26	227,43	0,08	0,11	0,18	0,03	0,76	0,27	779,45	65,61	8,57	6,31
ML19	0,18	0,26	324,86	0,08	0,11	0,18	0,05	0,80	0,26	717,23	95,32	8,91	6,17
ML20	0,18	0,26	79,18	0,16	0,22	0,19	0,03	0,93	0,28	790,71	46,46	15,14	3,25
ML21	0,18	0,26	75,69	0,14	0,19	0,19	0,03	0,60	0,28	804,56	36,96	12,57	3,69
ML22	0,18	0,26	74,80	0,04	0,05	0,20	0,03	0,57	0,30	612,79	10,49	37,54	13,27

Anexo 7

Tabla 8.7 Análisis bivariante de correlación de Pearson entre variables operacionales y fisicoquímicas del afluente y efluente

Variable	T	pH	SSVLM	DQO	DBO	NKTs	N-NH4+	CN-NH4+	P-PO4	CP-PO4	DBO5/ P-PO4	DBO5/ N-NH4+	CM DBO	TRH	TRHds	TRC	NTs	NKTs_e	N-NH4_e	N-NO2	N-NO3	rNKTs	
pH	0,40																						
SSVLM	-0,03	-0,29																					
DQO	0,18	-0,16	0,30																				
DBO	0,36	-0,09	0,31	0,89																			
NKTs	0,13	-0,13	0,18	0,15	0,24																		
N-NH4+	0,10	0,03	-0,05	-0,01	0,06	0,87																	
CN-NH4+	-0,05	0,06	-0,59	-0,09	-0,02	0,57	0,77																
P-PO4	0,28	0,19	-0,06	0,07	0,10	0,47	0,43	0,26															
CP-PO4	0,09	0,17	-0,61	-0,04	0,00	0,29	0,37	0,64	0,75														
DBO5/P-PO4	0,05	-0,23	0,30	0,61	0,67	-0,16	-0,26	-0,22	-0,67	-0,57													
DBO5/N-NH4+	0,23	-0,09	0,28	0,71	0,76	-0,37	-0,60	-0,52	-0,20	-0,23	0,71												
CM (DBO)	0,11	-0,12	-0,26	0,62	0,73	0,07	0,00	0,36	0,01	0,38	0,52	0,59											
TRH	-0,15	0,02	0,50	-0,09	-0,14	0,41	0,37	-0,15	0,43	-0,09	-0,40	-0,35	-0,57										
TRHds	0,33	0,26	0,34	-0,10	-0,15	0,15	0,17	-0,37	0,36	-0,22	-0,37	-0,23	-0,69	0,71									
TRC	0,13	0,51	-0,09	-0,38	-0,27	-0,25	-0,11	-0,13	0,15	0,08	-0,31	-0,14	-0,30	0,10	0,25								
NTs	0,27	0,12	0,07	-0,21	-0,11	0,09	0,18	0,08	0,33	0,20	-0,33	-0,20	-0,14	0,13	0,13	0,26							
NKTs_e	0,20	-0,20	0,26	-0,11	0,03	0,55	0,46	0,28	0,30	0,17	-0,20	-0,27	-0,02	0,07	-0,06	0,04	0,67						
N-NH4_e	0,06	-0,32	0,53	0,07	0,19	0,43	0,17	-0,06	0,28	0,02	-0,07	0,04	0,04	0,13	-0,06	-0,24	0,37	0,76					
N-NO2	-0,25	-0,38	-0,33	0,08	-0,03	-0,01	0,07	0,37	-0,01	0,35	-0,02	-0,08	0,31	-0,41	-0,54	-0,31	0,20	0,17	0,08				
N-NO3	-0,04	0,41	-0,40	-0,35	-0,37	-0,50	-0,22	-0,05	-0,01	0,09	-0,28	-0,16	-0,22	0,02	0,18	0,43	0,36	-0,32	-0,56	-0,04			
rNKTs	-0,18	0,25	-0,28	0,14	0,02	-0,34	-0,26	-0,12	-0,24	-0,11	0,19	0,18	0,05	0,01	0,08	-0,06	-0,65	-0,95	-0,80	-0,19	0,33		
rNTs	-0,06	-0,17	0,15	0,30	0,28	0,46	0,24	0,13	-0,09	-0,11	0,29	0,07	0,16	0,07	-0,05	-0,35	-0,75	-0,20	-0,02	-0,22	-0,70	0,33	

Anexo 8

Tabla 8.8 Análisis bivariante de correlación de Pearson entre variables operacionales y respirométricas

Variable	T	pH	SSVLM	DQO	DBO	NKTs	N-NH4+	CN-NH4+	P-PO4	CP-PO4	DBO5/ P-PO4	DBO5/ N-NH4+	CM DBO	TRH	TRHds	TRC	NTs	NKTs_e	N-NH4_e	N-NO2	N-NO3	rNKTs	rNTs
OURend.max	0,50	0,39	0,27	0,32	0,43	0,03	-0,11	-0,26	0,04	-0,18	0,30	0,42	0,12	0,11	0,22	0,32	0,17	0,10	0,00	-0,52	-0,05	-0,05	0,08
SOURend.max	0,49	0,55	-0,39	0,11	0,21	-0,10	-0,08	0,13	0,07	0,22	0,09	0,22	0,28	-0,21	-0,01	0,37	0,11	-0,08	-0,35	-0,29	0,21	0,13	-0,03
OURend.H	0,40	0,23	0,52	0,25	0,42	0,27	0,02	-0,24	-0,10	-0,39	0,38	0,32	0,06	0,10	0,12	-0,19	0,16	0,31	0,54	-0,33	-0,36	-0,27	0,17
SOURH	0,47	0,49	-0,19	0,05	0,23	0,17	0,06	0,18	-0,07	0,03	0,20	0,15	0,27	-0,28	-0,13	-0,14	0,14	0,15	0,20	-0,12	-0,09	-0,09	0,07
OURend.N	0,28	0,30	-0,05	0,13	0,13	-0,23	-0,22	-0,21	0,03	-0,03	0,08	0,25	0,02	0,07	0,22	0,57	0,10	-0,12	-0,40	-0,41	0,26	0,15	-0,08
SOURN	0,27	0,36	-0,34	0,06	0,06	-0,25	-0,17	-0,01	0,07	0,18	-0,01	0,16	0,12	-0,08	0,09	0,56	0,06	-0,20	-0,54	-0,28	0,34	0,22	-0,10
RsN	-0,44	-0,30	0,13	-0,15	-0,24	0,25	0,24	0,16	0,34	0,25	-0,41	-0,34	-0,13	0,46	0,03	-0,24	0,06	0,13	0,18	-0,05	0,02	-0,07	0,00
Rsp	-0,42	-0,22	-0,19	-0,26	-0,34	0,18	0,24	0,33	0,35	0,44	-0,51	-0,42	-0,05	0,28	-0,08	-0,18	0,03	0,05	0,00	0,05	0,13	0,02	-0,04
AUR´	-0,43	-0,30	0,10	-0,17	-0,25	0,24	0,22	0,16	0,34	0,27	-0,43	-0,34	-0,12	0,42	0,01	-0,21	0,05	0,13	0,16	-0,05	0,02	-0,06	0,00
AUR	-0,43	-0,30	0,10	-0,17	-0,25	0,23	0,22	0,16	0,34	0,28	-0,43	-0,34	-0,12	0,42	0,01	-0,20	0,04	0,12	0,15	-0,05	0,02	-0,06	0,01
AURmax	-0,60	-0,36	0,09	-0,19	-0,31	0,17	0,16	0,14	0,23	0,22	-0,39	-0,35	-0,13	0,40	-0,07	-0,21	-0,03	0,06	0,12	0,02	0,03	-0,01	0,02
µN	-0,11	-0,48	-0,01	0,39	0,27	0,17	0,04	0,13	-0,16	-0,03	0,32	0,19	0,36	-0,20	-0,29	-0,98	-0,31	-0,11	0,17	0,34	-0,40	0,11	0,35
µNmax	-0,41	-0,59	0,00	0,31	0,15	0,09	-0,03	0,12	-0,28	-0,07	0,32	0,14	0,33	-0,18	-0,42	-0,92	-0,43	-0,20	0,11	0,40	-0,40	0,19	0,40
FN	-0,21	0,05	-0,33	-0,87	-0,88	0,03	0,21	0,25	0,11	0,20	-0,74	-0,83	-0,60	0,18	0,14	0,25	0,23	0,20	-0,03	-0,03	0,26	-0,20	-0,24
CN	-0,35	-0,24	0,21	-0,17	-0,26	0,28	0,27	0,07	0,41	0,19	-0,48	-0,38	-0,28	0,60	0,26	-0,18	0,09	0,12	0,16	-0,17	0,06	-0,05	-0,02

Anexo 9

Especie	T	pH	SSV	DQO	DBO	NKTs	N-NH4	TRH	TRHds	TRC	DBO5/P-PO4	DBO5/N-NH4	CM (DBO)	CN-NH4	CP-PO4	NTs
Acica	-0,29	0,14	-0,18	0,13	-0,11	-0,21	-0,20	0,03	0,00	0,26	-0,11	0,05	0,00	-0,06	0,08	-0,34
Acin	-0,47	-0,07	0,33	-0,05	-0,10	0,17	0,00	0,34	-0,13	0,31	-0,06	-0,08	-0,12	-0,08	-0,08	-0,23
Ades	0,13	-0,36	-0,14	0,42	0,35	0,01	-0,03	-0,56	-0,50	-0,66	0,38	0,30	0,50	0,17	0,09	-0,20
Arce	-0,25	0,06	0,46	0,02	-0,04	0,24	0,09	0,33	0,23	0,29	-0,03	-0,10	-0,35	-0,20	-0,28	0,02
Auncin	-0,37	-0,06	0,05	0,02	-0,12	-0,32	-0,16	0,03	0,13	0,13	-0,08	0,01	-0,12	-0,19	-0,08	-0,24
Centro	-0,11	-0,02	0,33	0,27	0,26	0,70	0,52	0,29	-0,11	-0,15	0,00	-0,14	0,12	0,33	0,18	-0,10
Ebala	0,05	-0,21	0,29	0,34	0,32	0,00	-0,01	-0,15	-0,25	-0,31	0,37	0,26	0,25	-0,05	-0,17	-0,14
Ento	0,10	0,22	-0,19	0,11	0,07	-0,10	-0,14	0,12	0,01	0,23	-0,09	0,14	0,11	-0,01	0,27	-0,03
Gastro	0,02	0,17	0,52	0,09	0,08	0,22	0,15	0,26	0,22	0,09	0,05	-0,03	-0,23	-0,17	-0,33	0,35
Holo	0,40	0,01	-0,17	-0,05	0,01	-0,05	0,09	0,01	0,09	-0,19	-0,14	-0,05	0,06	0,11	0,21	0,37
Llam	-0,58	-0,36	0,38	0,16	0,12	-0,04	-0,14	0,19	-0,09	-0,15	0,15	0,19	0,03	-0,23	-0,16	-0,11
Oarti	-0,46	0,23	-0,12	-0,49	-0,54	-0,32	-0,16	0,15	0,14	0,28	-0,18	-0,33	-0,45	-0,09	-0,28	0,21
Pera	-0,16	-0,32	0,26	-0,21	-0,07	0,25	0,22	0,19	-0,08	0,30	-0,06	-0,19	-0,07	0,10	-0,02	0,24
Pfluvi	-0,29	-0,32	0,13	-0,10	-0,16	0,13	0,21	0,46	0,33	0,13	-0,19	-0,27	-0,29	0,02	-0,03	0,02
Plagio	0,23	-0,19	0,65	0,29	0,41	0,23	0,00	0,02	0,02	-0,12	0,51	0,33	0,07	-0,31	-0,50	-0,43
Rota	0,12	0,20	-0,49	-0,07	-0,08	-0,25	-0,14	-0,25	-0,16	-0,18	-0,06	0,03	0,17	0,15	0,32	-0,04
Sticho	-0,10	-0,45	0,10	0,11	0,03	0,13	0,28	-0,01	-0,01	-0,52	-0,02	-0,15	0,04	0,16	0,02	0,09
Tinfu	-0,55	-0,59	0,22	0,13	0,08	-0,22	-0,24	-0,19	-0,26	-0,20	0,38	0,22	0,15	-0,18	-0,33	-0,31
Tminu	-0,28	-0,45	0,46	0,30	0,14	0,37	0,31	0,23	-0,08	-0,25	0,14	-0,09	0,01	0,09	-0,16	0,04
Unigri	0,35	0,17	-0,53	-0,02	-0,11	-0,22	-0,12	-0,17	0,13	-0,08	-0,11	-0,01	0,00	0,07	0,19	-0,08
Vaqua	-0,02	-0,62	0,41	0,36	0,31	0,17	-0,04	-0,12	-0,26	-0,48	0,31	0,27	0,20	-0,13	-0,14	-0,17
Ymicro	0,03	0,53	-0,42	-0,19	-0,29	-0,56	-0,41	-0,14	0,16	0,52	-0,25	0,04	-0,15	-0,18	0,11	0,21
Especie	NKTs e	N-NH4 e	N-NO2	N-NO3	rNKTs	rNTs	OURend.max	SOURend.max	OURend.H	SOURH	OURend.A	SOURA	RsN	AUR	AURmax	
Acica	-0,38	-0,41	-0,10	0,22	0,39	0,08	0,12	0,24	-0,36	-0,28	0,46	0,47	0,26	0,29	0,32	
Acin	0,07	0,13	-0,09	-0,27	-0,05	0,36	0,15	-0,07	0,02	-0,25	0,17	0,08	0,28	0,30	0,36	
Ades	-0,01	0,08	0,69	-0,32	0,00	0,11	-0,37	-0,27	-0,03	0,07	-0,45	-0,36	-0,24	-0,24	-0,24	
Arce	0,25	0,34	0,01	-0,30	-0,21	0,22	0,04	-0,26	0,30	-0,01	-0,11	-0,25	-0,27	-0,28	-0,19	
Auncin	-0,38	-0,21	0,07	0,33	0,33	-0,21	-0,40	-0,40	-0,36	-0,45	-0,17	-0,18	0,31	0,33	0,38	
Centro	0,48	0,43	-0,02	-0,70	-0,33	0,67	0,20	-0,03	0,32	0,09	-0,09	-0,15	0,23	0,22	0,21	
Ebala	0,04	0,17	0,13	-0,22	-0,09	0,02	-0,04	-0,22	0,10	-0,11	-0,11	-0,18	0,08	0,05	0,03	
Ento	-0,24	-0,40	-0,14	0,25	0,25	-0,04	0,50	0,60	-0,21	-0,09	0,69	0,72	0,17	0,17	0,12	
Gastro	0,51	0,59	-0,30	-0,30	-0,56	-0,08	0,24	-0,12	0,58	0,25	-0,15	-0,30	-0,09	-0,13	-0,13	
Holo	0,09	-0,03	0,04	0,17	-0,19	-0,40	0,11	0,22	-0,09	0,04	0,14	0,19	0,10	0,08	-0,03	
Llam	-0,09	0,30	0,24	-0,15	0,07	0,11	-0,21	-0,45	0,12	-0,15	-0,31	-0,41	0,13	0,11	0,23	
Oarti	-0,16	-0,16	-0,17	0,59	0,09	-0,48	-0,22	-0,12	-0,10	-0,01	-0,05	-0,06	-0,08	-0,11	0,00	
Pera	0,46	0,29	-0,05	-0,11	-0,45	-0,06	-0,12	-0,28	-0,13	-0,35	-0,04	-0,10	0,10	0,11	0,13	
Pfluvi	-0,06	-0,19	0,08	0,22	0,11	-0,04	-0,11	-0,17	-0,41	-0,55	0,21	0,16	0,36	0,35	0,38	
Plagio	0,20	0,31	-0,43	-0,66	-0,15	0,63	0,30	-0,15	0,47	0,02	-0,01	-0,20	-0,04	-0,02	-0,07	
Rota	-0,41	-0,33	0,19	0,20	0,40	-0,04	0,04	0,35	-0,07	0,30	0,08	0,21	-0,05	-0,05	-0,07	
Sticho	0,11	0,22	0,33	-0,21	-0,13	0,01	-0,52	-0,56	-0,13	-0,23	-0,58	-0,56	0,25	0,24	0,24	
Tinfu	-0,13	0,08	0,15	0,05	0,10	0,01	-0,34	-0,45	-0,17	-0,34	-0,21	-0,27	0,13	0,12	0,24	
Tminu	0,40	0,39	0,14	-0,45	-0,40	0,22	-0,05	-0,34	0,06	-0,30	-0,11	-0,22	0,28	0,25	0,28	
Unigri	-0,43	-0,61	0,16	0,36	0,45	-0,11	0,12	0,46	-0,27	0,10	0,33	0,47	-0,03	-0,01	-0,09	
Vaqua	0,21	0,35	0,40	-0,56	-0,22	0,34	-0,08	-0,34	0,10	-0,21	-0,21	-0,29	0,16	0,15	0,14	
Ymicro	-0,34	-0,41	-0,23	0,71	0,23	-0,64	0,13	0,40	-0,25	0,05	0,40	0,48	-0,21	-0,20	-0,18	

Anexo 10

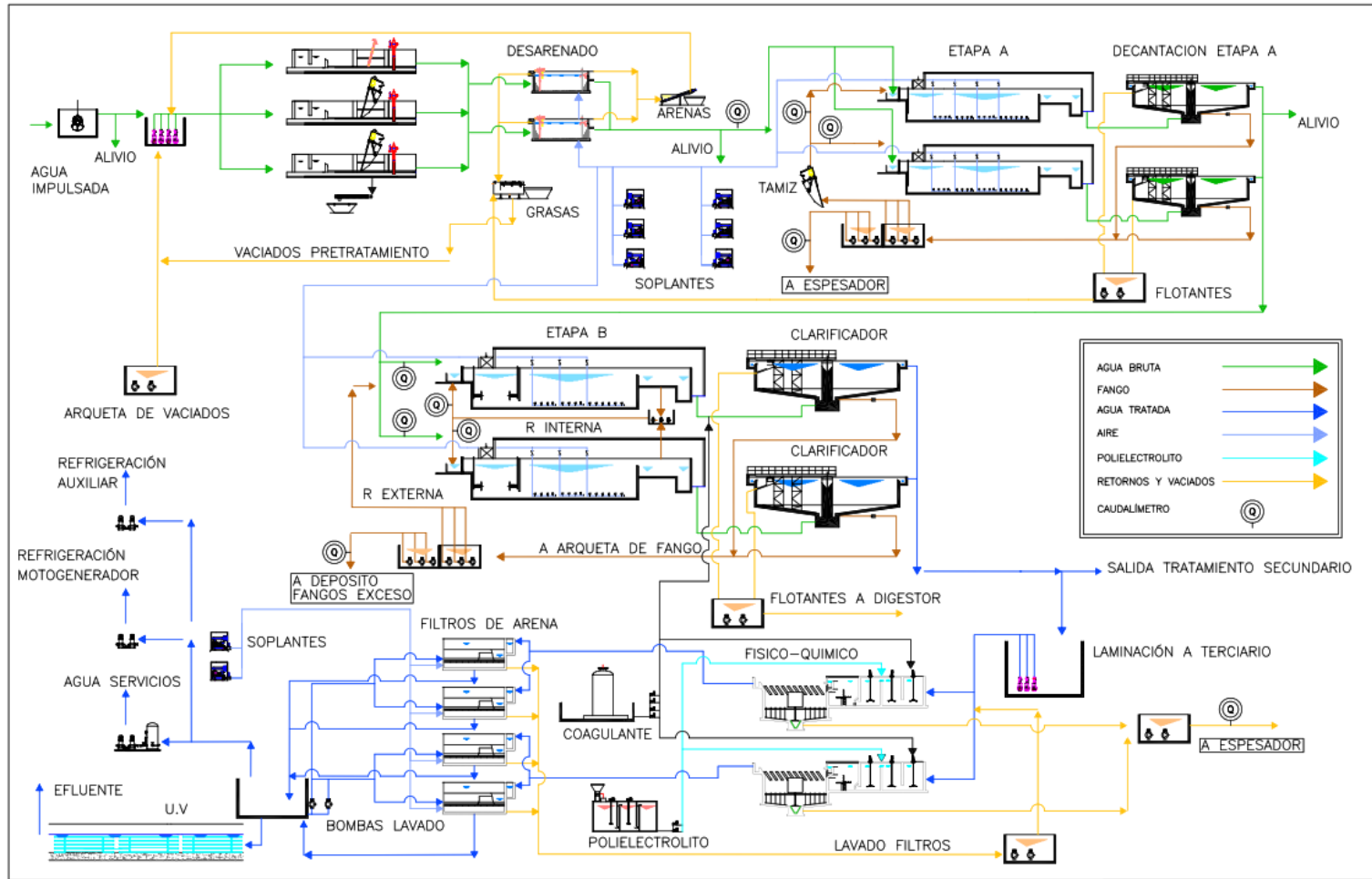


Figura 8.1 Diagrama de flujo EDAR Molina de Segura

Anexo 11

Tabla 8.9 Variables ambientales complementarias

Variable	Q.rec.ext	%Q.rec.ext	Q.rec.int	%Q.rec.int	SSLM	%SSVLM	CondLM	PTs of	SST_of	DQOT_of	DQOs of	DQOp of	%DQOs	DQO/DBO	DBO/DQOs	SSTrec	R.rec	CCM2	CCM3	CCM2*3	CM(DQO)	CPTs	DQOs/NTs	DBO5/NTs
ML1	30543	227	25359	189	7380	91	3530	6,2	340	1132	851	281	75	1,26	1,06	14015	1,9	5126	4718	9844	0,141	1,03	12,24	12,95
ML2	30540	206	25664	173	7180	90	3800	5,2	280	1110	1010	100	91	1,27	0,87	13359	1,86	4539	3971	8510	0,193	0,99	13,84	11,99
ML3	32735	254	27048	210	8505	89	3510	6,5	245	1071	720	351	67	1,26	1,18	15613	1,84	5774	4389	10163	0,102	0,93	11,58	13,67
ML4	32613	167	19421	99	5925	86	3660	6	235	1021	707	314	69	1,28	1,13	15776	2,66	5232	4312	9544	0,226	1,91	11,42	12,92
ML5	28391	206	29517	214	5720	89	3420	6	235	1050	705	345	67	1,54	0,96	14600	2,55	2943	3324	6267	0,159	1,35	11,69	13,27
ML6	36293	246	32960	224	5550	88	3010	5,3	185	1081	731	350	68	2,15	0,69	14799	2,67	4092	3743	7835	0,184	1,34	11,94	8,2
ML7	39597	175	33399	148	5600	87	2950	5	150	1109	890	219	80	1,26	0,99	14506	2,59	4374	3994	8368	0,344	1,94	17,35	17,1
ML8	33296	210	33074	208	5565	90	3220	7,4	160	1084	887	197	82	1,34	0,91	14101	2,53	4692	4230	8922	0,235	1,95	13,02	11,89
ML9	36509	222	33402	203	7710	88	3000	1,6	180	911	659	252	72	1,57	0,88	17435	2,26	4265	3544	7809	0,133	0,32	13,84	12,18
ML10	29614	208	25703	181	7210	88	4330	5,1	220	750	330	420	44	2,19	1,04	13633	1,89	4455	3631	8086	0,062	0,96	6,88	7,13
ML11	30917	211	28467	194	6600	87	4050	5,4	220	1020	710	310	70	1,31	1,1	8547	1,3	3878	3349	7227	0,151	1,15	14,14	15,54
ML12	40660	278	29701	203	6395	88	4250	5,3	150	840	551	289	66	1,7	0,9	7890	1,23	3255	6237	9492	0,119	1,13	12,96	11,62
ML13	37051	255	30785	212	5360	87	4560	5,2	145	943	653	290	69	1,35	1,07	7454	1,39	5412	4306	9718	0,171	1,35	9,82	10,53
ML14	34110	193	30518	173	5395	87	3240	4,2	155	929	715	214	77	1,65	0,79	7898	1,46	4014	3371	7385	0,223	1,31	11,68	9,2
ML15	30368	202	29119	194	4900	87	4080	5,8	150	549	291	258	53	2,14	0,88	6929	1,41	3257	2802	6059	0,085	1,71	5,29	4,65
ML16	31774	216	26012	177	5200	87	3590	7,7	255	1127	779	348	69	1,5	0,96	6776	1,3	3098	3498	6596	0,212	2,08	14,06	13,54
ML17	35649	216	31965	193	5570	87	3380	4,8	150	843	582	261	69	1,53	0,95	8392	1,51	4436	4212	8648	0,166	1,37	10,6	10,02
ML18	21129	143	25154	170	5925	87	3350	5	230	1143	787	356	69	1,4	1,04	8695	1,47	3738	3654	7392	0,187	1,18	17	17,62
ML19	20688	142	17480	120	5300	86	3480	5,2	100	473	283	190	60	1,47	1,14	8601	1,62	10770	2704	13474	0,075	1,38	4,86	5,53
ML20	26139	177	20393	138	5340	87	3460	5,5	230	1009	598	411	59	1,35	1,25	18010	3,37	10632	3317	13949	0,159	1,46	10,6	13,3
ML21	24949	159	26871	171	5395	87	3450	4,3	245	1133	677	456	60	1,62	1,03	17810	3,3	11907	3875	15782	0,189	1,19	14,98	15,44
ML22	21756	135	26204	162	5445	85	3380	4,2	140	913	644	269	71	1,3	1,09	4690	0,86	11405	3493	14898	0,186	1,21	14,74	16,02

