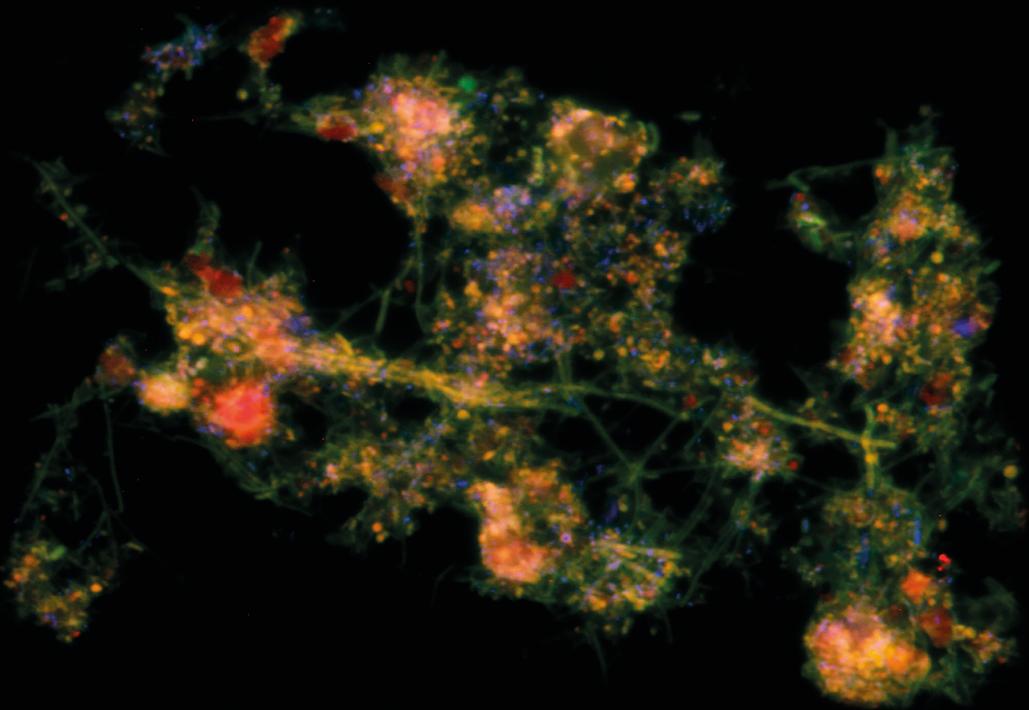




UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Influencia de las características físicas y químicas del licor de mezcla en Bioreactores de Membrana y su correlación con los parámetros de operación en aguas residuales urbanas e industriales



PRESENTADO POR
Elena Zuriaga Agustí

DIRIGIDO POR
Dr. José Antonio Mendoza Roca
Dra. M^a Amparo Bes Piá
Dr. José Luis Alonso Molina

Valencia, Septiembre 2017



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



isiry

Instituto de Seguridad Industrial,
Radiofísica y Medioambiental

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
INGENIERÍA Y PRODUCCIÓN INDUSTRIAL

**Influencia de las características físicas y
químicas del licor de mezcla en
Biorreactores de Membrana y su
correlación con los parámetros de
operación en aguas residuales urbanas e
industriales**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Elena Zuriaga Agustí

Dirigida por:

Dr. José Antonio Mendoza Roca

Dra. M^a Amparo Bes Piá

Dr. José Luis Alonso Molina

Valencia, Septiembre 2017

AGRADECIMIENTOS

No me gustaría finalizar este camino sin dedicar unas palabras a aquellas personas que de un modo u otro han estado presentes a lo largo de este tiempo y que han hecho posible que por fin tenga la Tesis.

En primer a mis directores José Antonio Mendoza, Amparo Bes y José Luís Alonso, muchas gracias por todo el apoyo que me habéis dado para seguir adelante, por vuestra dedicación, consejos y ánimos. Habéis hecho que entre charlas y quinielas el trabajo sea más fácil.

Quisiera agradecer a las empresas TECVASA y URBASER la facilidad prestada a la hora de tomar las muestras para la realización de esta Tesis y toda la información necesaria.

También quisiera agradecer a la empresa FACSA la oportunidad que me ha dado para seguir adelante trabajando en el campo de la I+D y de los MBR, concretamente a Guillermo por confiar en mí y a todos mis compañeros que también me han apoyado para pelear con la Tesis.

Quisiera acordarme de los profesores del Departamento de Ingeniería Química y Nuclear que han estado presentes a lo largo de esta Tesis, como Isabel Iborra e Isabel Alcaina. También de José Felipe por su ayuda para entender mejor la estadística.

Y como no, a mis compañeros y amigos “L@s chic@s de abajo”, sin su compañía, apoyo, risas y cafés de máquina no hubieran sido lo mismo todos estos años. *Mª José*, sempre al meu costat, rient, treballant, fent-se fotos i totes les tonteries que se’ns ocorrien dins i fora del lab, espere que sempre continuem així. *Eva*, la mare del grup i la més calorosa, gràcies per aportar trellat, per les conversacions politiqueres i fer que m’entere de les sèries en anglés. Y la tercera *modelito*, y no por ello menos importante, *Irene*, que llegaste de Asturias a hacer la Tesis y ya te has hecho valencianeta, también hemos compartido muchos momentos buenos, tanto dentro como fuera del poli. Espero que la tradición del viaje anual no la perdamos nunca.

José Luís, eres un gran company, moltes gràcies per estar sempre ahí, bé per a arreglar l'ordinador com per a ajudar en el lab. *Carlos*, siempre aportando tranquilidad al grupo e ilustrándonos en la pizarra. *Elena*, por todos esos momentos que hemos compartido trabajando juntas con la planta, y escribiendo papers. Aunque estás a muchos km de distancia me alegra que sigamos en contacto. *Sergio*, el otro miembro del *paper team*, muchas gracias por tu ayuda todos estos años, tanto en la planta como a nivel personal. Tú, junto a *M^a Carmen* y *Mónica* sois muy especiales para mí, ya que fuisteis mis primeros compañeros y siempre habéis estado ahí.

Gracias a los técnicos de laboratorio que han estado durante todos estos años ayudándome, a Laura, de nuevo a Sergio, y a Luís y Rafa. Rita, gracias por tus consejos, y Bianca, que a pesar de ser las dos de arriba os habéis integrado con los de abajo. También agradecer a Luís Borrás su ayuda con el Matlab.

Es difícil nombrar a todas las personas que durante todos estos años han compartido el laboratorio conmigo, como Edu y Gabriel·la, con los que pasé momentos muy buenos midiendo proteínas, o Silvia, Adrià, Rubén, Rebeca, Chiara, Anissa, Yeny, Giovanni, Angélica, Andrea, Daniele y tantos otros como Arun y Laia, o los momentos en la CPI en el mciro o con respirometrías con Inma, Andrés, Julián... todos habéis aportado un trocito de esta Tesis. Gracias por todos esos momentos vividos juntos.

También, agradecer a Ewan McAdam el darme la oportunidad de realizar la estancia en Cranfield University, donde hice grandes amigos como Martina y Sudeep, y a Olivier Autin por toda la ayuda que me dio.

I no me puc oblidar de la meua familia i Alberto, que han estat aguantant els meus nervis i mal humor quan les coses no eixien com jo volia, gràcies per estar ahí. Per fí, ja està! Alberto gracias por el apoyo de todos estos años.

Per últim, també em vull acordar de les meues cousins, tíos, familia política i amics que han estat estos anys al meu costat.

ÍNDICE

RESÚMENES	XIX
PREFACIO	XXVII
NOTACIÓN.....	XXXI
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1. DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES	3
1.1. PROCESO BIOLÓGICOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES ...	3
1.1.1. Fundamentos del proceso de fangos activos	5
1.1.2. Clasificación de los microorganismos presentes en un proceso	7
de fangos activos	7
1.2. PARÁMETROS QUE DEFINEN EL PROCESO BIOLÓGICO.....	9
2. TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS	10
2.1. INTRODUCCIÓN A LOS PROCESOS DE MEMBRANA	10
2.2. MATERIALES DE MEMBRANA	12
2.3. PARÁMETROS QUE DEFINEN EL COMPORTAMIENTO DE LA	13
MEMBRANA	13
2.4. MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN Y ULTRAFILTACIÓN.....	14
2.5. ENSUCIAMIENTO DE LAS MEMBRANAS	15
2.5.1. Polarización por concentración	17
3. BIORREACTOR DE MEMBRANAS (MBR).....	19
3.1. EVOLUCIÓN DE LOS BIORREACTORES DE MEMBRANA.....	21
3.2. VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL PROCESO MBR.....	23
3.3. CONFIGURACIÓN DEL BIORREACTOR DE MEMBRANAS.....	26
3.4. CONFIGURACIÓN DE LAS MEMBRANAS DEL MBR	30
3.5. LIMPIEZA DE LAS MEMBRANAS	32
3.6. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN Y	33
CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA EN EL FUNCIONAMIENTO DEL MBR.	33
.....	33
4. BIORREACTOR DE MEMBRANAS PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS	40
.....	40
5. BIBLIOGRAFÍA.....	44

CAPÍTULO II: OBJETIVOS	49
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE LICOR DE MEZCLA.....	55
1.1 EDAR URBANA.....	55
1.2 EDAR INDUSTRIALES.....	57
2. ESQUEMA DE LAS MUESTRAS PROCESADAS.....	58
3. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL LICOR DE MEZCLA.....	63
3.1. SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN EN EL LICOR DE MEZCLA.....	63
3.1.1. Sólidos en suspensión totales en el licor de mezcla (SSLM)..	63
3.1.2. Sólidos en suspensión volátiles en el licor de mezcla (SSVLM) .	64
3.2. REOLOGÍA DEL FANGO ACTIVO.....	66
3.2.1. Procedimiento experimental para el estudio de la reología .	72
3.3. TIEMPO DE SUCCIÓN CAPILAR.....	75
3.4. POTENCIAL ZETA	77
3.4.1. Determinación del punto isoeléctrico.....	79
3.5. TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	80
3.6. DETERMINACIÓN DE LAS RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN.....	81
3.7. ULTRAFILTRACIÓN DEL LICOR DE MEZCLA EN LABORATORIO.....	88
3.8. ULTRAFILTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS EN LABORATORIO.....	88
4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL LICOR DE MEZCLA.....	90
4.1. DETERINACIÓN DE LAS SUSTANCAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS) Y PRODUCTOS SOLUBLES MICROBIANOS (SMP)	90
4.1.1. Método de extracción con la resina CER en 2 etapas	93
4.1.2. Método de extracción con la resina CER en 1 etapa	98
4.1.3. Método de extracción con el detergente Triton® X-100.....	99
4.2. EXTRACCIÓN DE EPS Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	102
4.3. MÉTODO DE ADICIÓN ESTÁNDAR.....	105

4.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	108
4.4.1. Método BCA	108
4.4.2. Método Micro BCA	112
4.4.3. Método Lowry modificado.....	114
4.5. ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS	117
4.5.1. Método Dubois.....	117
4.5.2. Método Antrona	119
4.6. ANÁLISIS DE ADN	122
4.7. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO DE ALTA RESOLUCIÓN (HPSEC).....	124
4.8. ESPECTROFOTÓMETRO DE FLUORESCENCIA (FSEEM).....	124
5. ANÁLISIS DEL AGUA RESIDUAL.....	125
6. RESPIROMETRÍA DEL FANGO ACTIVO.....	125
7. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DEL LICOR DE MEZCLA	127
7.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DEL FANGO ACTIVO	127
7.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	127
7.2.1. Fijación de la muestra	131
7.2.2. Tinción de proteínas	132
7.2.3. Tinción de carbohidratos	133
7.2.4. Tinción de ácidos nucleicos.....	134
7.2.5. Tratamiento y evaluación de las imágenes tomadas al microscopio de epifluorescencia.....	135
7.3. VIABILIDAD CELULAR.....	138
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	140
9. BIBLIOGRAFÍA.....	141
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	145
1. ENSAYOS PRELIMINARES	147
1.1. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS	147
1.2. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	148
1.3. SELECCIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	149

Índice General

2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL LICOR DE MEZCLA.....	152
2.1. PRODUCTOS SOLUBLES MICROBIANOS (SMP) Y SUSTANCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES EXTRAÍDAS (eEPS)	152
3. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL LICOR DE MEZCLA.....	164
3.1. REOLOGÍA DEL FANGO ACTIVO.....	164
3.2. RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN.....	172
3.2.1. Cálculo de las resistencias a la filtración	172
3.2.2. Influencia de los SSLM en las resistencias a la filtración.....	177
3.2.3. Influencia de la viscosidad en las resistencias a la filtración	180
3.2.4. Influencia de los SMP y eEPS en las resistencias a la filtración	181
3.3. TIEMPO DE SUCCIÓN CAPILAR.....	188
3.4. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS.....	192
4. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DEL LICOR DE MEZCLA.....	196
4.1. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DEL LICOR DE MEZCLA CON MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES	196
4.2. VIABILIDAD CELULAR.....	201
4.3. CARACTERIZACIÓN DE EPS MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA	203
5. MBR INDUSTRIAL.....	210
5.1. CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL	210
5.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL LICOR DE MEZCLA	212
5.2.1. Productos solubles microbianos (SMP) y sustancias poliméricas extracelulares (eEPS).....	212
5.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL LICOR DE MEZCLA	219
5.3.1. SSLM y SSVLM.....	219
5.3.2. Ensayos de ultrafiltración del licor de mezcla. Resistencias a la filtración	220
5.3.3. Tiempo de succión capilar	226
5.3.4. Reología del fango activo	226

5.3.5. Potencial zeta	228
5.4. RESPIROMETRÍA	229
6. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN Y LAS CARACTERIZACIONES REALIZADAS.....	233
6.1. INFLUENCIA DEL TRH Y LA C_m EN LOS PARÁMETROS MEDIDOS EN EL LICOR DE MEZCLA PROCEDENTE DEL MBR URBANO.....	233
6.2. COMPARACIÓN ENTRE LAS eEPS Y SMP PROCEDENTES DE LOS TRES MBR ESTUDIADOS: URBANO E INDUSTRIALES	239
6.3. REGRESIÓN DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)	243
6.3.1. MBR urbano	243
6.3.2. MBR Industrial	248
7. ESTUDIO DEL ENSUCIAMIENTO DE LAS MEMBRANAS POR LAS PROTEÍNAS DE LAS eEPS	258
7.1. ESTUDIO CON PROTEÍNAS COMERCIALES	258
7.1.1. Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas	258
7.1.2. Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución de las proteínas sintéticas.....	260
7.1.3. Concentración de proteínas sintéticas por precipitación mediante adición de sulfato amónico	260
7.2. ESTUDIO CON PROTEÍNAS PURIFICADAS DE LAS eEPS.....	262
7.2.1. Determinación del punto isoeléctrico y comparación con proteínas sintéticas comerciales	262
7.2.2. Determinación del ratio proteína/carbohidrato mediante tres métodos de extracción y purificación de proteínas por precipitación.....	264
7.2.3. Caracterización de las SMP, eEPS y las proteínas purificadas de las eEPS mediante HPSEC. Comparación con proteínas sintéticas	265
7.2.4. Espectro de excitación y emisión	266
7.2.5. Ensayos de UF con disoluciones de las proteínas purificadas de las eEPS	268
7.2.6. Influencia de la adición de alginato de sodio, en las disoluciones de proteínas de los eEPS purificadas, en los ensayos de UF.....	270

Índice General

8. BIBLIOGRAFÍA.....	274
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	281
ANEXOS	295

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Introducción

Figura I.1: Proceso de fangos activos.....	5
Figura I.2: Esquema de funcionamiento de una membrana	11
Figura I.3: Ensuciamiento por bloqueo de poro: precipitación (a), obturación del poro (b), Constricción del poro (c) y formación de agregado (d)	17
Figura I.4: Fenómeno de polarización por concentración.....	18
Figura I.5: Configuración MBR con membrana sumergida.....	27
Figura I.6: Configuración MBR con membrana externa	28
Figura I.7: Esquema de limpieza de membranas con contralavado.....	32
Figura I.8: Esquema de limpieza de membranas mediante la aireación.....	33
Figura I.9: Comportamiento de las EPS sobre la superficie de la membrana.....	35
Figura I.10: Esquema de los parámetros que afectan al ensuciamiento de las membranas y métodos de control	37
Figura I.11: Influencia de los parámetros de operación en el ensuciamiento de las membranas	38

CAPÍTULO III: Material y Métodos

Figura III.1: EDAR Loriguilla	56
Figura III.2: Esquema del proceso de depuración de la EDAR de Loriguilla.....	56
Figura III.3: Análisis para las muestras de licor de mezcla del MBR urbano (SERIE 1). 60	
Figura III.4: Análisis para las muestras de licor de mezcla del MBR urbano (SERIE 2). 61	
Figura III.5: Análisis para las muestras de licor de mezcla del MBR industrial (SERIE 3)	62
Figura III.6: Representación del esfuerzo cortante frente a la velocidad de corte para distintos fluidos.	67
Figura III.7: Representación del comportamiento de un fluido tixotrópico.	68
Figura III.8: Configuración de un sistema de Flujo de Couette-Taylor. Sin formación de vórtice de Taylor (a) y con vórtice de Taylor (b) [8]	71
Figura III.9: Reómetro HAAKE RheoStress 1	73
Figura III.10: Esquema de la geometría (cilindro concéntrico) del sensor utilizado, modelo Z34DIN.....	74
Figura III.11: Equipo de medida del tiempo de succión capilar	75
Figura III.12: Equipo de medición de Potencial Zeta, Zetasizer Nano ZS90.....	77

Índice de Figuras

Figura III.13: Configuración óptica del Zetasizer Nano ZS (Fuente: Malvern).....	78
Figura III.14: Equipo de medición del tamaño de partículas. Mastersizer 2000.....	80
Figura III.15: Esquema de una planta de UF.....	81
Figura III.16: Módulo Rayflow®.....	82
Figura III.17: Esquemas de extracciones de EPS con resina CER y con Triton X-100	92
Figura III.18: Esquema de extracción de EPS con el método CER en 2 etapas.....	93
Figura III.19: Centrífuga refrigerada.....	94
Figura III.20: Separación de fases tras centrifugación.....	95
Figura III.21: Proceso de extracción de EPS mediante la resina CER.....	96
Figura III.22: Filtración del extracto previo al almacenamiento a -20°C.....	96
Figura III.23: Muestras de EPS obtenidas tras las extracciones con resina CER.....	97
Figura III.24: Esquema de extracción de EPS con Homogeneizador + CER.....	98
Figura III.25: Esquema de extracción de EPS con el método Triton® X-100.....	100
Figura III.26: Muestras de EPS obtenidas tras las extracciones con Triton X-100..	101
Figura III.27: Procedimiento para la purificación de proteínas con (NH ₄) ₂ SO ₄	104
Figura III.28: Método Adición estándar: Ejemplo método BCA.....	106
Figura III.29: Baño a 37° C con los eppendorfs sumergidos.....	110
Figura III.30: Aspecto de las muestras de la recta de calibrado a la salida del baño.....	110
Figura III.31: Recta de calibrado del Método BCA.....	111
Figura III.32: Recta de calibrado del Método Micro BCA.....	113
Figura III.33: Reactivos y disoluciones preparadas.....	115
Figura III.34: Cubetas con la disolución de la recta de calibrado con el método Lowry.....	116
Figura III.35: Recta de calibrado del Método Lowry.....	116
Figura III.36: Cubetas con la disolución de la recta de calibrado con el método Dubois.....	118
Figura III.37: Recta de calibrado del Método Dubois.....	119
Figura III.38: Baño a 100° C y baño con hielo.....	121
Figura III.39: Cubetas con la disolución de la recta de calibrado con el método Antrona.....	121
Figura III.40: Recta de calibrado del Método Antrona.....	121
Figura III.41: Fluorómetro utilizado para la determinación del ADN.....	123
Figura III.42: Respirómetro SURCIS BM-Advance.....	126

Figura III.43: Esquema del funcionamiento del microscopio de fluorescencia. Ejemplo de tinción realizada con el fluorocromo FITC.....	128
Figura III.44: Microscopio OLYMPUS BX50F utilizado en los ensayos con lámpara de mercurio de alta presión 100-W.....	129
Figura III.45: Muestras fijadas en la muestra 1	132
Figura III.46: Portaobjetos con las muestras fijadas y teñidas.....	135
Figura III.47: Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia tomadas con diferentes filtros: verde, rojo y azul y superposición de imágenes (izquierda). Imágenes procesadas con Image Software Toolbox de Matlab (derecha.).....	137
Figura III.48: Método de viabilidad celular con SYTO9 y Ioduro de Propidio	138
Figura III.49: Imagen de viabilidad celular procesada con el programa BioImageL™	139

CAPÍTULO IV: Resultados y Discusión

Figura IV.1: Método de Adición Estándar aplicado al análisis de proteínas con ácido bicinconínico (BCA).....	150
Figura IV.2: Método de Adición Estándar aplicado al análisis de carbohidratos con Antrona.....	151
Figura IV.3: Concentración de los productos solubles microbianos (SMP) en las 40 muestras	153
Figura IV.4: Concentración de proteínas y carbohidratos contenidos en las eEPS extraídas con el método Triton X-100.....	157
Figura IV.5: Concentración de proteínas y carbohidratos contenidos en las EPS extraídas con CER en 2 etapas.....	158
Figura IV.6: Concentración de proteínas y carbohidratos contenidos en las EPS extraídas con CER en 1 etapa	159
Figura IV.7: Distribución de proteínas, carbohidratos y ADN en las eEPS extraídas con los métodos Triton X-100, CER 1 etapa y CER 2 etapas.....	163
Figura IV.8: Evolución del esfuerzo cortante a diferentes velocidades de deformación en las 20 muestras de licor de mezcla procedentes del MBR urbano	165
Figura IV.9: Viscosidad aparente y esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación de la muestra del licor de mezcla M19.....	166
Figura IV.10: Número de Taylor frente a las velocidades de deformación ensayadas para la muestra de licor de mezcla M19.....	167
Figura IV.11: Influencia de la concentración de los sólidos en suspensión en el licor de mezcla en la formación del vórtice de Taylor	168

Índice de Figuras

Figura IV.12: Evolución de la viscosidad aparente con la concentración de sólidos en suspensión de licor de mezcla, a siete velocidades de deformación en régimen laminar	169
Figura IV.13: Reograma experimental y ajustes de los modelos de Ostwald, Bingham, Herschel-Bulkley y Casson para la muestra M19.....	171
Figura IV.14: Reograma obtenido experimentalmente y ajuste obtenido mediante el modelo de Ostwald ($n = 0.3752$, $k = 0.2545 \text{ mPa} \cdot (\text{s})^{0.3752}$) para la muestra M19 (SSLM = 11.4 g/L)	172
Figura IV.15: Resistencias a la filtración (R_{rev} , R_{irrev} y R_t) en las 20 muestras de licor de mezcla procedentes del MBR urbano	173
Figura IV.16: Resistencias al bloqueo de poro R_{irrev} (m^{-1}) y Resistencias a la formación de torta R_{rev} (m^{-1}), en las 20 muestras de licor del fango procedentes del MBR urbano.....	175
Figura IV.17: Resistencia a la formación de torta R_{rev} (m^{-1}) frente a la densidad de flujo de permeado normalizado	176
Figura IV.18: Resistencia al bloqueo de poro R_{irrev} (m^{-1}) frente a la densidad de flujo de permeado normalizado	176
<i>Figura IV.19: Influencia de los sólidos en suspensión del licor de mezcla (SSLM) en la densidad de flujo de permeado</i>	<i>177</i>
Figura IV.20: Influencia de los sólidos en suspensión en el licor de mezcla (SSLM) con la resistencia reversible	178
Figura IV.21: Influencia de los sólidos en suspensión en el licor de mezcla (SSLM) con la resistencia irreversible	179
<i>Figura IV.22: Influencia de la viscosidad ($\gamma = 354 \text{ s}^{-1}$) en la resistencia total al ensuciamiento</i>	<i>180</i>
<i>Figura IV.23: Influencia de la viscosidad ($\gamma = 354 \text{ s}^{-1}$) en la densidad de flujo de permeado....</i>	<i>181</i>
Figura IV.24: Influencia de las proteínas de los compuestos solubles microbianos en la resistencia a la formación de torta (R_{rev})	182
Figura IV.25: Influencia de las proteínas de los compuestos solubles microbianos en la resistencia al bloqueo de poro.....	182
Figura IV.26: Influencia de las proteínas de los compuestos solubles microbianos en el flujo de permeado normalizado.....	184
Figura IV.27: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con el método CER en la resistencia a la formación de torta.....	185
Figura IV.28: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con el método CER en la resistencia al bloqueo de poro	185
Figura IV.29: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con el método Triton X-100 en la resistencia a la formación de torta	186

Figura IV.30: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con el método Triton X-100 en la resistencia al bloqueo de poro.....	186
Figura IV.31: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con los métodos CER y Triton X-100, en la densidad de flujo de flujo de permeado.....	187
Figura IV.32: Tiempo de succión capilar medido con tubo largo y corto en las 20 muestras del MBR urbano.....	188
Figura IV.33: Influencia de la viscosidad de las muestras de licor de mezcla en el tiempo de succión capilar.....	191
Figura IV.34: Distribución del tamaño de partículas de las muestras de licor de mezcla 1, 5, 10, 15 y 20.....	192
Figura IV.35: Metazoos presentes en el licor de mezcla, rotífero (a) y nematodo (b) (400x).....	197
Figura IV.36: Protozoos presentes en el licor de mezcla, vorticelas (400x).....	197
Figura IV.37: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas del licor de mezcla (200x).	197
Figura IV.38: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas del licor de mezcla MBR urbano (100x).....	198
Figura IV.39: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas del licor de mezcla MBR-LS (100x).....	199
Figura IV.40: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas del licor de mezcla MBR-HS (100x).....	200
Figura IV.41: Imágenes de viabilidad celular para la muestra 10 del MBR urbano	201
Figura IV.42: Valores promedios de células viables (verdes), dañadas (rojas) y otros (violeta) para el MBR urbano.....	202
Figura IV.43: Proteínas, carbohidratos, ADN y eEPS totales en la M10 (Nosyk)....	204
Figura IV.44: Proteínas, carbohidratos, ADN y eEPS totales en la M10 (Nosyk)....	205
Figura IV.45: Proteínas, carbohidratos, ADN y eEPS totales en la M10 (Sun).....	208
Figura IV.46: Concentración de proteínas (a) y carbohidratos (b) en los SMP del licor de mezcla del MBR-HS y MBR-LS.....	214
Figura IV.47: (a) Filamentos con apariencia de aguja similar a la tinción de Haliscomenobacter. con DAPI. (b) Filamentos de Haliscomenobacter identificados con la sonda SAP-309 usando la técnica FISH (S3, MBR-HS) [48].....	216
Figura IV.48: Concentración de proteínas (eEPSp) y carbohidratos (eEPSc) en las EPS extraídas del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS (método CER 2 etapas).....	217
Figura IV.49: Concentración de proteínas (eEPSp) y carbohidratos (eEPSc) en las EPS extraídas del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS (método CER 1 etapa).....	217

Índice de Figuras

Figura IV.50: Concentración de proteínas (eEPSp) y carbohidratos (eEPSc) en las EPS extraídas del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS (método Triton X-100).....	218
Figura IV.51: Aspecto de la corriente de permeados obtenidos tras la ultrafiltración del licor de mezcla del MBR-LS (izqda.) y MBR-HS (drcha.).....	222
Figura IV.52: Ensayos de ultrafiltración a escala de laboratorio. Evolución de densidad de flujo de permeado utilizando licor de mezcla del MBR-LS (a) y MBR-HS (b). PTM = 1 bar, T = 25°C y v = 2 m/s.....	223
Figura IV.53: Permeabilidad de la membrana al agua antes y después del ensayo de ensuciamiento con licor de mezcla del MBR-LS (tras la limpieza de la membrana con agua destilada)	225
<i>Figura IV.54: Permeabilidad de la membrana al agua antes y después del ensayo de ensuciamiento con licor de mezcla del MBR-HS (tras la limpieza de la membrana con agua destilada)</i>	<i>225</i>
Figura IV.55: Comparación entre la viscosidad aparente y esfuerzo cortante del licor de mezcla del MBR-LS y del MBR-HS (muestra 2).....	227
Figura IV.56: Evolución de la tasa de respiración (Rs en mgO ₂ /L·h) al adicionar acetato de sodio al licor de mezcla del MBR-HS.....	230
Figura IV.57: Evolución de la tasa de respiración (Rs en mgO ₂ /L·h) al adicionar lixiviado al licor de mezcla.....	230
Figura IV.58: Evolución de la tasa de respiración (Rs en mgO ₂ /L·h) al adicionar lixiviado filtrado al licor de mezcla.....	231
Figura IV.59: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) el TSC, (b) la viscosidad y (c) el tamaño medio de partícula, del licor de mezcla procedente del MBR urbano, con el TRH.....	234
Figura IV.60: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) las eEPS, (b) las eEPSp y (c) las eEPSc, extraídas del licor de mezcla procedente del MBR urbano, con el TRH. Método de extracción Triton X-100	236
Figura IV.61: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) el TSC, (b) la viscosidad y (c) el tamaño medio de partícula, del licor de mezcla procedente del MBR urbano, en función de la Cm	237
Figura IV.62: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) las eEPS y (b) las eEPSp, extraídas del licor de mezcla procedente del MBR urbano, en función de la Cm. Método de extracción Triton X-100.....	238
Figura IV.63: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) eEPS totales, (b) eEPSp y (c) eEPSc extraídas de las muestras de licor de mezcla del MBR urbano, MBR-HS y MBR-LS. Método de extracción Triton X-100	240
Figura IV.64: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) eEPS totales, (b) eEPSp y (c) eEPSc extraídas de las muestras de licor de mezcla del MBR urbano, MBR-HS y MBR-LS. Método de extracción CER 2 etapas.....	241

Figura IV.65: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) SMP totales, (b) SMPp y (c) SMPc de las muestras de licor de mezcla del MBR urbano, MBR-HS y MBR-LS	242
Figura IV.66: Gráfico de dispersión de las 20 observaciones del modelo eEPS Triton y CER).....	245
Figura IV.67: Círculos de correlación (Biplot) con las variables Y (Triton EPS, Triton EPSp, Triton EPSc, CER EPS, CER EPSp y CER EPSc), las variables X (TSC, viscosidad, SSLM, d(0,9), D[4,3], Jp, Cm y TRH) y las 20 observaciones del MBR urbano.....	246
<i>Figura IV.68: Dispersión de los pesos de las variables SMPp y SMPc (Loading Scatter Plot)</i>	<i>247</i>
<i>Figura IV.69: Dispersión de los pesos de las variables Triton eEPS, Triton eEPSp y Triton eEPSc (Loading Scatter Plot).....</i>	<i>247</i>
<i>Figura IV.70: Dispersión de los pesos de las variables CER eEPS, CER eEPSp y CER eEPSc en 2 etapas (Loading Scatter Plot).....</i>	<i>248</i>
Figura IV.71: Gráfico de dispersión de las 15 observaciones del modelo MBR-LS.	250
Figura IV.72: Valores de la variable Y (SMP) observados frente a los predichos por el modelo del MBR-LS	250
Figura IV.73: Dispersión de los pesos de la variable SMP del MBR-LS (Loading Scatter Plot).....	251
Figura IV.74: Biplot. Círculos de correlación obtenidos para la variable Y (SMP) con las variables X estudiadas y las 15 observaciones del MBR-LS	252
Figura IV.75: Gráfico de dispersión de las 15 observaciones del modelo MBR-HS	254
Figura IV.76: Valores de la variable Y (SMP) observados frente a los predichos por el modelo del MBR-HS.....	254
Figura IV.77: Dispersión de los pesos de la variable SMP del MBR-HS (Loading Scatter Plot).....	255
Figura IV.78: Biplot. Círculos de correlación obtenidos para la variable Y (SMP) con las X variables estudiadas y las 15 observaciones del MBR-HS	256
<i>Figura IV.79: Punto isoeléctrico obtenido experimentalmente para las proteínas sintéticas.....</i>	<i>258</i>
Figura IV.80: Evolución de la intensidad relativa al analizar las proteínas sintéticas en el HPSEC	260
Figura IV.81: Efecto de la adición de sulfato amónico en la concentración de proteína sintética de cada disolución	261
Figura IV.82: Pellet obtenido tras purificar proteína BSA sintética.....	262
Figura IV.83: Potencial Zeta de las eEPS y de las eEPS extraídas y purificadas.....	263

Índice de Figuras

Figura IV.84: Evolución de la intensidad relativa al analizar las SMP, eEPS y las proteínas purificadas de las eEPS en el HPSEC	265
Figura IV.85: Evolución de la intensidad relativa al analizar las proteínas purificadas de las eEPS en el HPSEC y comparación con la proteína BSA	266
Figura IV.86: Espectro de fluorescencia excitación-emisión de las eEPS.....	267
Figura IV.87: Evolución de la presión transmembranal usando como alimento disoluciones de proteína purificada, a diferentes valores de pH.....	268
Figura IV.88: Evolución del rechazo de la membrana de ultrafiltración a las proteínas usando como alimento disoluciones de proteína purificada a diferentes valores de pH	269
Figura IV.89: Valoración turbidimétrica para sistema binario formado por la mezcla de 50 mg/L de proteína purificada de las eEPS junto con 50 mg/L de alginato de sodio.....	270
Figura IV.90: Evolución de la presión transmembranal usando como alimento disoluciones de proteína purificada + alginato de sodio a diferentes valores de pH	272
Figura IV.91: Evolución del rechazo de la membrana de ultrafiltración a las proteínas usando como alimento disoluciones de proteína purificada + alginato de sodio a diferentes valores de pH	273

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I: Introducción

Tabla I.1: Clasificación de los procesos de membrana cuya fuerza impulsora es la presión.....	11
Tabla I.2: Comparación entre configuración de MBR con membranas sumergidas y externas.....	30
Tabla I.3: Comparación entre configuración de membranas de fibra hueca y planas en MBR.....	32
Tabla I.4: Información bibliográfica sobre MBR que tratan lixiviado.....	42

CAPÍTULO III: Material y Métodos

Tabla III.1: Características de las membranas.....	57
Tabla III.2: Características del módulo RayFlow® 100.....	83
Tabla III.3: Propiedades de la membrana.....	83
Tabla III.4: Porcentaje de saturación de (NH ₄) ₂ SO ₄ y cantidad a adicionar.....	104
Tabla III.5: Método de adición estándar: ejemplo determinación de proteínas ...	105
Tabla III.6: Fluorocromos utilizados en las tinciones.....	130
Tabla III.7: Fluorocromos utilizados para teñir las EPS según Nosyk y Sun.....	130

CAPÍTULO IV: Resultados y Discusión

Tabla IV.1: Productos solubles microbianos (SMP) y sus componentes.....	153
Tabla IV.2: EPS totales, componentes de las eEPS extraídas con el método Triton X-100 y ratio proteína/carbohidrato.....	155
Tabla IV.3: Concentración y composición de las eEPS extraídas con los métodos Triton X-100, CER en una etapa y en dos etapas. Ratio P/C.....	161
Tabla IV.4: Parámetros de los modelos reológicos aplicados y coeficiente de correlación para la muestra de licor de mezcla M19.....	170
Tabla IV.5: Contribución de cada tipo de resistencia a la resistencia total.....	174
Tabla IV.6: Resultados del TSC, TSC normalizado y viscosidad en función del rango de la concentración de biomasa (n=20).....	189
Tabla IV.7: Coeficientes de correlación de Pearson (r_p) y P-valores para correlaciones lineales entre el TSC y otras propiedades del fango activo.....	190
Tabla IV.8: Diámetro medio en volumen y percentiles (μm) en las 20 muestra de licor de mezcla.....	193
Tabla IV.9: Coeficientes de correlación de Pearson (r_p) y P-valores para correlaciones lineales entre el DTP y otras propiedades del fango activo.....	194

Índice de Tablas

Tabla IV.10: Porcentajes de células viables (verdes), dañadas (rojas) y otros (NS), determinados con el software BiImageL™v2.1.....	202
Tabla IV.11: Valores obtenidos de media, desviación estándar e incertidumbre al procesar las imágenes del microscopio de epifluorescencia con la rutina programada en Matlab	206
Tabla IV.12: Caracterización del agua residual afluyente a los MBR industriales....	211
Tabla IV.13: Concentración de sólidos en suspensión totales y volátiles en las muestras del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS.....	219
Tabla IV.14: Resistencias a la filtración obtenidas con el licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS.....	221
Tabla IV.15: Potencial zeta (mV) medido en la fracción soluble del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS	228
Tabla IV.16: Fraccionamiento de la DQO obtenido mediante espectrofotometría y respirometría	231
Tabla IV.17: Parámetros del modelo de regresión PLS en el MBR urbano	244
Tabla IV.18: Parámetros del modelo de regresión PLS en el MBR-LS y MBR-HS ...	249
Tabla IV.19: Punto isoelectrico experimental y peso molecular de las proteínas sintéticas	259
Tabla IV.20: Concentración de proteínas y carbohidratos y ratio P/C, en las eEPS y en los pellets, procedentes de la purificación de las proteínas, de las 3 etapas de extracción..	264

RESÚMENES

TÍTULO: “Influencia de las características físicas y químicas del licor de mezcla en Biorreactores de Membrana y su correlación con los parámetros de operación en aguas residuales urbanas e industriales”.

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio de la influencia de los parámetros de operación del proceso de fangos activos en las características físicas y químicas de los licores de mezcla, procedentes de diferentes biorreactores de membrana (MBR). Además, se ha realizado una caracterización óptica del licor de mezcla.

Para ello, en primer lugar se tomaron muestras del licor de mezcla de un MBR que trata aguas residuales urbanas y, a continuación, se evaluaron las características de los licores de mezcla de dos MBR que tratan los lixiviados procedentes de dos plantas de tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU). Cabe destacar que la diferencia entre los dos MBR industriales radica en la alimentación (afluentes) al MBR, que viene determinada por el tratamiento que se realiza a la FORSU, ya que uno de ellos consiste en una digestión anaerobia en vía húmeda (MBR-LS) y, el otro, en una digestión anaerobia en vía seca (MBR-HS), por lo que este último lixiviado contiene mayor concentración de sólidos en suspensión en su composición.

Para la caracterización química del licor de mezcla, se han analizado las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), formadas por la suma de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) y los productos solubles microbianos (SMP). Estas sustancias se consideran las principales causantes del ensuciamiento de las membranas del MBR y están formadas básicamente por proteínas y polisacáridos, los cuales pueden estar tanto adheridos a la pared celular como fuera de la célula, en forma de eEPS o SMP.

En cuanto a la caracterización física, en concreto se ha analizado y estudiado el efecto en el ensuciamiento de las membranas de los sólidos en

Resúmenes

suspensión totales y volátiles, la viscosidad, el tiempo de succión capilar y el tamaño de partícula, medido a través de las resistencias a la filtración.

Finalmente, en el MBR urbano se ha estudiado la viabilidad celular con microscopía de epifluorescencia, así como se han teñido para su caracterización óptica los principales componentes de las EPS por dos métodos distintos.

Además, mediante un estudio estadístico se ha evaluado el efecto de los principales parámetros de operación de los MBR sobre los parámetros de caracterización del licor de mezcla. Mediante regresión por mínimos cuadrados se han estudiado los parámetros operacionales que influyen en la producción de SMP en los MBR industriales.

El estudio se ha completado evaluando el ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración con proteínas extraídas de las EPS y posteriormente purificadas con sulfato amónico, a diferentes valores de pH. Para ello, en primer lugar se han caracterizado diferentes proteínas sintéticas (albúmina de suero bovino, caseína, hemoglobina y lisozima) para compararlas con las proteínas extraídas del licor de mezcla. También se ha estudiado el ensuciamiento de la membrana con las proteínas purificadas de las eEPS junto con alginato de sodio en la misma proporción.

Los resultados obtenidos demuestran en primer lugar que los SMP juegan un papel importante en el ensuciamiento de las membranas. Tanto en su composición como en la de las eEPS, la concentración de proteínas determinada ha sido considerablemente mayor que la de carbohidratos, si bien éstos influyen incluso en mayor medida en la filtrabilidad del fango activo. Además, se demuestra que las bacterias bajo condiciones de estrés, causado por ejemplo por aumento de conductividad, aumentan la producción de SMP, y por tanto, se incrementa el ensuciamiento de las membranas. Por otro lado, se concluye que un tiempo de retención hidráulico bajo favorece una concentración elevada de carbohidratos y consecuentemente provoca un aumento de la viscosidad y el tiempo de succión capilar, aumentando también el ensuciamiento de la membrana.

TÍTOL: “Influència de les característiques físiques i químiques del licor de mescla en Biorreactors de Membrana i la seua correlació amb els paràmetres d'operació en aigües residuals urbanes i industrials”.

RESUM

En la present Tesi Doctoral s'ha dut a terme l'estudi de la influència dels paràmetres d'operació del procés de fangs actius en les característiques físiques i químiques de licors de mescla, procedents de diferents biorreactors de membrana (MBR). A més, s'ha realitzat una caracterització òptica del licor de mescla.

Per a això, en primer lloc es van prendre mostres del licor de mescla d'un MBR que tracta aigües residuals urbanes i, a continuació, es van avaluar les característiques dels licors de mescla de dos MBR que tracten els llixiviats procedents de dues plantes de tractament de la fracció orgànica dels residus sòlids urbans (FORSU). Cal destacar que la diferència entre els dos MBR industrials radica en l'alimentació (afluents) al MBR, que ve determinada pel tractament que es realitza a la FORSU, ja que un d'ells consisteix en una digestió anaeròbia en via humida (MBR-LS) i, l'altre, en una digestió anaeròbia en via seca (MBR-HS), per la qual cosa este últim llixiviats conté major concentració de sòlids en suspensió en la seua composició.

Per a la caracterització química del licor de mescla, s'han analitzat les substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS), formades per la suma de les substàncies polimèriques extracel·lulars extretes (eEPS) i els productes solubles microbians (SMP). Estes substàncies es consideren les principals causants de l'embrutiment de les membranes del MBR i estan formades bàsicament per proteïnes i polisacàrids, els quals poden estar tant adherits a la paret cel·lular com fora de la cèl·lula, en forma d'eEPS o SMP.

Quant a la caracterització física, en concret s'ha analitzat i estudiat l'efecte en l'embrutiment de les membranes dels sòlids en suspensió totals i

Resúmenes

volàtils, la viscositat, el temps de succió capil·lar i la grandària de partícula, mesurat a través de les resistències a la filtració.

Finalment, en el MBR urbà s'ha estudiat la viabilitat cel·lular amb microscòpia d'epifluorescència, així com s'han tenyit per a la seua caracterització òptica els principals components de les EPS per dos mètodes distints.

A més, per mitjà d'un estudi estadístic s'ha avaluat l'efecte dels principals paràmetres d'operació dels MBR sobre els paràmetres de caracterització del licor de mescla. Per mitjà de regressió per mínims quadrats s'han estudiat els paràmetres operacionals que influeixen en la producció de SMP en els MBR industrials.

L'estudi s'ha completat avaluant l'embrutiment d'una membrana d'ultrafiltració amb proteïnes extretes de les EPS i posteriorment purificades amb sulfat amònic, a diferents valors de pH. Per a això, en primer lloc s'han caracteritzat diferents proteïnes sintètiques (albúmina de sèrum boví, caseïna, hemoglobina i lisozima) per a comparar-les amb les proteïnes extretes del licor de mescla. També s'ha estudiat l'embrutiment de la membrana amb les proteïnes purificades de les eEPS junt amb alginat de sodi en la mateixa proporció.

Els resultats obtinguts demostren en primer lloc que els SMP juguen un paper important en l'embrutiment de les membranes. Tant en la seua composició com en la de les eEPS, la concentració de proteïnes determinada ha sigut considerablement major que la de carbohidrats, si bé estos influeixen inclús en major grau en la filtrabilidad del fang actiu. A més, es demostra que els bacteris baix condicions d'estrès, causat per exemple per augment de conductivitat, augmenten la producció de SMP, i per tant, s'incrementa l'embrutiment de les membranes. D'altra banda, es conclou que un temps de retenció hidràulic baix afavoreix una concentració elevada de carbohidrats i conseqüentment provoca un augment de la viscositat i el temps de succió capil·lar, augmentant també l'embrutiment de la membrana.

TITLE: “Influence of the physical and chemical characteristics of the mixed liquor on Membrane Bioreactors and its correlation with the operating parameters in urban and industrial wastewater”.

ABSTRACT

In this Doctoral Thesis the study of the influence of the operating parameters of the activated sludge process on the physical and chemical characteristics of the mixed liquor, from different membrane bioreactors (MBR), has been carried out. In addition, an optical characterization of the mixing liquor has been performed.

In order to achieve the above mentioned aim, samples of the mixed liquor from an MBR treating municipal wastewater were first analysed and then, the characteristics of two MBR mixed liquors treating the leachates from two treatment plants of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) were evaluated. It is noteworthy that the difference between the two industrial MBR lies on the feeding (inlet) to the MBR, which is determined by the treatment performed to the OFMSW, since one of them consists of a wet anaerobic digestion (MBR-LS) and the other of a dry anaerobic digestion (MBR-HS), so that the latter leachate contains higher concentration of suspended solids in its composition.

For the chemical characterization of the mixture liquor, the extracellular polymeric substances (EPS) have been analysed. EPS are formed by the sum of extracted extracellular polymeric substances (eEPS) and soluble microbial products (SMP). These substances are considered the main cause of membranes fouling in MBRs and are basically formed by proteins and polysaccharides, which can be both attached to the cell wall and outside the cell, in form of eEPS or SMP.

Regarding the physical characterization, in particular it has been analysed and studied the effect on the membrane fouling of the total and volatile suspended solids, the viscosity, the capillary suction time and the particle size, measured through the resistance to filtration.

Resúmenes

Finally, in the municipal MBR, cell viability with epifluorescence microscopy has been studied, as well as the main components of EPS have been stained by two different methods.

In addition, a statistical study has evaluated the effect of the main operating parameters of the MBR on the characterization parameters of the mixed liquor. By means of least squares regression, the operational parameters that influence SMP production in industrial MBR have been studied.

The study was completed by evaluating the fouling of an ultrafiltration membrane with proteins extracted from EPS and subsequently purified with ammonium sulphate at different pH values. To this end, different synthetic proteins (bovine serum albumin, casein, haemoglobin and lysozyme) were first analysed and then compared with the proteins extracted from the mixed liquor. Membrane fouling with purified eEPS proteins has also been studied along with sodium alginate added in the same concentration as the proteins.

The results obtained demonstrate, firstly, that SMP play an important role in the membrane fouling. The concentration of proteins has been considerably higher than that of carbohydrates both in SMP and in eEPS, although SMP influenced to a greater extent on the filtration of the activated sludge. In addition, it is shown that bacteria under stress conditions, caused for example by increase in conductivity, increase the production of SMP, and therefore, membrane fouling increases. On the other hand, it is concluded that a low hydraulic retention time favours a high carbohydrates concentration and consequently drives to an increase in the viscosity and capillary suction time, also increasing the membrane fouling.

PREFACIO

PREFACIO

El presente trabajo de investigación, centrado en el estudio de las características físicas, químicas y ópticas del licor de mezcla en Biorreactores de Membrana (MBR) y su correlación con los parámetros de operación, se ha llevado a cabo dentro del Programa de Doctorado en Ingeniería y Producción Industrial de la Escuela de Doctorado de la Universitat Politècnica de València. El trabajo se inició en el marco de un proyecto de investigación financiado por la Generalitat Valenciana con referencia GV/2009/017 y de un convenio de investigación llevado a cabo con la empresa URBASER.

Además, se ha realizado una estancia de tres meses y medio en un centro de investigación extranjero, concretamente en *Cranfield Water Science Institute* (Cranfield University) ubicado en Reino Unido. Este centro cuenta con reconocida experiencia en el campo del tratamiento de aguas y específicamente en el campo de los biorreactores de membrana, pudiendo optar de este modo a la Mención Internacional del título de Doctor.

Por otra parte, la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a participaciones en varios congresos de ámbito internacional y la publicación de dos artículos en revistas internacionales con un alto índice de impacto (*Water Research* y *Separation and Purification Technology*). En el Anexo I se proporcionan los detalles de dichas contribuciones, incluyendo la primera página de cada uno de los artículos publicados, donde se indica la referencia, los autores y el DOI.

La Tesis se ha estructurado en cinco capítulos, cuyo contenido se detalla a continuación. En el Capítulo I se realiza una introducción a los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales y a la tecnología de membranas. A continuación, se describen específicamente los biorreactores de membrana (MBR), detallándose las ventajas e inconvenientes de esta tecnología, así como las diferentes configuraciones existentes y la influencia de los parámetros de operación en el funcionamiento del MBR.

Prefacio

En el Capítulo II, se expone el objetivo principal de la Tesis Doctoral así como los objetivos específicos que permitirán la consecución del mismo. En el Capítulo III se describe la metodología experimental seguida, así como los materiales y equipos empleados para la realización de este estudio, junto con los métodos analíticos y técnicas de caracterización empleadas. En el Capítulo IV se presentan los resultados obtenidos durante la fase experimental de la Tesis. Este capítulo se divide a su vez en diferentes secciones donde se muestran los ensayos preliminares, la caracterización química, física y óptica del licor de mezcla procedente del MBR urbano y de los dos MBR industriales. Además, se detallan las correlaciones estadísticas entre los parámetros de operación y las caracterizaciones realizadas. Finalmente, se incluyen los resultados obtenidos del trabajo realizado durante la estancia en la Universidad de Cranfield, donde se estudió principalmente el ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración a partir de disoluciones de proteínas purificadas de las eEPS extraídas, a diferentes valores de pH. Cada capítulo muestra al final del mismo el listado de referencias consultadas.

Por último, en el Capítulo V se muestran las principales conclusiones obtenidas a partir del trabajo realizado.

NOTACIÓN

A	Área efectiva de membrana (m ²)
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
CER	Resina de intercambio catiónico (de <i>cation exchange resin</i>)
Cm	Carga másica (kgDBO ₅ /kg SSLM·d o kgDQO/kg SSVLM·d)
DQO	Demanda química de oxígeno (mg/L)
DQOs	Demanda química de oxígeno soluble (mg/L)
DTP	Distribución del tamaño de partículas (μm)
D [4,3]	Diámetro medio en volumen (μm)
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares (de <i>extracellular polymeric substances</i>) (mg/gSSV)
eEPS	Sustancias poliméricas extracelulares extraídas (mg/gSSV)
eEPSp	Proteínas en las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (mg/gSSV)
eEPSc	Carbohidratos en las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (mg/gSSV)
FORSU	Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
HPSEC	Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución
Jp	Densidad de flujo de permeado (L/m ² ·h)
Jw	Densidad de flujo de permeado al agua (L/m ² ·h)
LSD	Mínima diferencia significativa (de <i>least significant difference</i>)
MBR	Biorreactor de membranas (de <i>membrane biorreactor</i>)
MBR-HS	Biorreactor de membranas con alta concentración de sólidos (HS de <i>high solids</i>)
MBR-LS	Biorreactor de membranas con baja concentración de sólidos (LS de <i>low solids</i>)

Notación

MF	Microfiltración
NT	Nitrógeno total (mg/L)
NTs	Nitrógeno total soluble (mg/L)
N-NH ₄ ⁺	Nitrógeno amoniacal (mg/L)
OC	Consumo de oxígeno (mg/L) (de <i>oxygen consume</i>)
P	Presión (bar)
P/C	ratio proteína/carbohidrato
PES	Polietersulfona hidrofílica
PI	Punto isoeléctrico (mV)
PLS	Regresión por mínimos cuadrados parciales (<i>Partial Least Squares</i>)
PVDF	Polivinilideno de Fluoruro
PTM	Presión transmembranal (bar)
PZ	Potencial zeta (mV)
Q	Caudal (m ³ /h)
R _{irrev}	Resistencia irreversible (m ⁻¹)
R _m	Resistencia intrínseca de la membrana (m ⁻¹)
R _{rev}	Resistencia reversible (m ⁻¹)
R _t	Resistencia total a la filtración (m ⁻¹)
R _s	Tasa de respiración (mg/L·h)
r _p	Coefficiente de correlación de Pearson
SMP	Productos solubles microbianos (mg/L) (de <i>soluble microbial products</i>)
SMPp	Proteínas en los productos solubles microbianos (mg/L)
SMPc	Carbohidratos en los productos solubles microbianos (mg/L)
SS	Sólidos en suspensión (mg/L)
SSLM	Sólidos en suspensión en el licor de mezcla (mg/L)

Notación

SSVLM	Sólidos en suspensión volátiles en el licor de mezcla (mg/L)
T	Temperatura (°C)
t	Tiempo (s)
Ta	Número de Taylor
TRH	Tiempo de retención hidráulico (h)
TSC	Tiempo de succión capilar (s)
UF	Ultrafiltración
V	Volumen (L)
Y_H	Coefficiente de rendimiento de la biomasa heterótrofa
λ	Longitud de onda (nm)
η	Viscosidad aparente (mPa·s)
$\dot{\gamma}$	Gradiente de velocidades (s ⁻¹)
τ	Esfuerzo cortante (Pa)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

La generación de aguas residuales es una consecuencia de la actividad humana, la cual contamina el agua natural y hace necesaria la aplicación de un tratamiento para su posterior vertido o reutilización. La Ley de Aguas de 2001, define la contaminación como “la acción y el efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores, con la salud humana, o con los ecosistemas acuáticos o terrestres directamente asociados a los acuáticos; causen daños a los bienes; y deterioren o dificulten el disfrute y los usos del medio ambiente”[1].

Con el fin de proteger el medio ambiente, la Directiva 91/271/CEE, modificada por la Directiva 98/15/CE, define los sistemas de recogida, tratamiento y vertido de las aguas residuales urbanas y procedentes de sectores industriales. Esta Directiva europea se ha transpuesto a la normativa española por el Real Decreto Ley 2116/1998 [2]. El cumplimiento de esta normativa ha implicado la construcción y remodelación de plantas de tratamiento de aguas residuales para garantizar los requerimientos exigidos actualmente por la legislación. En 2015 se registraron un total de 2940 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) en España.

1.1. PROCESOS BIOLÓGICOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales se deben someter a tratamientos físicos, químicos y biológicos con el objeto de reducir sus contaminantes y permitir su vertido o reutilización. Estos tratamientos se realizan en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales, denominadas EDAR.

Cuando las aguas residuales llegan a una EDAR, el primer tratamiento que se realiza es la retirada de sólidos y partículas de gran tamaño, así

Introducción

como la separación de las arenas, aceites y grasas, en la etapa que se conoce como *pretratamiento*. A continuación, el agua pasa al *tratamiento primario*, donde se eliminan principalmente los sólidos en suspensión fácilmente sedimentables. El agua residual, con la materia orgánica disuelta y en suspensión, pasa entonces al *tratamiento secundario* donde se elimina la materia orgánica disuelta o coloidal mediante el proceso biológico de depuración. Éste puede ser aerobio o anaerobio dependiendo de si interviene o no el oxígeno. El tratamiento biológico más extendido en depuración, debido a su bajo coste y sencilla operación, es el aerobio también llamado proceso de fangos activos. Finalmente, aquellas depuradoras que alcanzan mejor calidad del efluente y por ello consiguen reutilizar el agua tratada, cuentan con un *tratamiento terciario*. Se trata de un tratamiento más avanzado en el que se eliminan los sólidos en suspensión y materia orgánica residual así como nutrientes (nitrógeno y fósforo) y patógenos.

Los procesos biológicos aerobios tienen lugar gracias a la presencia de microorganismos, principalmente bacterias, que en presencia de oxígeno son capaces de asimilar la materia orgánica presente en el agua residual, con el fin de incorporarla a su metabolismo celular y obtener energía para sus funciones vitales. Esta energía será utilizada a su vez para la síntesis de nuevas células.

Las bacterias tienden a unirse formando *flóculos*, es decir, agregados que contienen partículas orgánicas e inorgánicas, así como un consorcio microbiano (bacterias formadoras de flóculo y bacterias filamentosas), unido mediante una matriz de sustancias poliméricas extracelulares.

Los flóculos forman lo que se conoce como *fango activo* o *licor de mezcla* del reactor biológico y se separan mediante sedimentación en el decantador secundario. Una parte de los fangos decantados se purga como fangos en exceso y otra es recirculada al reactor biológico para mantener la concentración de microorganismos.

En la Figura I.1 se muestra el esquema del proceso convencional de fangos activos, el cual fue desarrollado en 1914 en Inglaterra por Arden y Lockett [3].

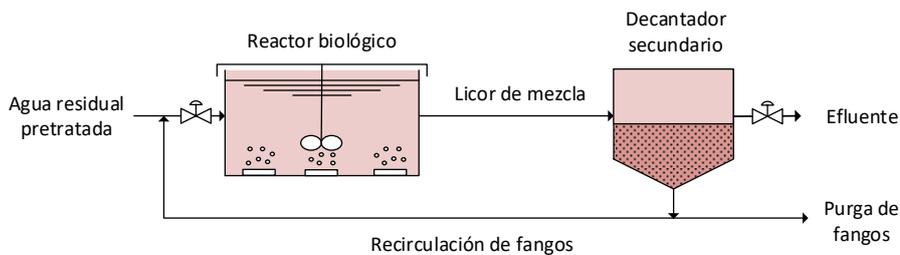


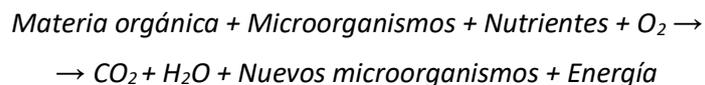
Figura I.1: Proceso de fangos activos

1.1.1. Fundamentos del proceso de fangos activos

Para que tenga lugar el proceso de oxidación biológica de la materia orgánica presente en el agua residual, los microorganismos necesitan:

- Energía para desarrollar sus actividades metabólicas
- Una fuente de carbono para realizar la síntesis celular
- Oxígeno
- Nutrientes

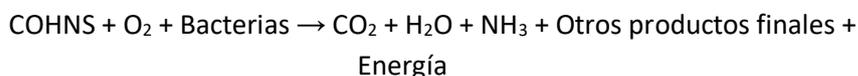
El proceso de oxidación biológica se engloba en la siguiente reacción:



Para que se lleve a cabo esta reacción es necesario que tengan lugar dos tipos de reacciones:

Reacción de oxidación (catabolismo): Los microorganismos necesitan energía para poder realizar sus funciones vitales. Dicha energía la obtienen al transformar la materia orgánica en dióxido de carbono, agua y otros productos según la siguiente reacción exotérmica.

Introducción

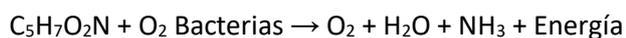


Reacción de síntesis (anabolismo): consiste en la asimilación por parte de los microorganismos de la materia orgánica y los nutrientes, creándose nuevos microorganismos. En este caso se trata de una reacción endotérmica, en la que las enzimas tienen un papel importante para aumentar la velocidad de la reacción.



Donde COHNS representa los elementos predominantes en la materia orgánica presente en el agua residual y $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ la composición media de los microorganismos encargados de la biodegradación de la materia orgánica [4].

Una vez que la materia orgánica disponible es consumida, las células consumen su propio tejido celular con el fin de obtener energía para el mantenimiento celular. Este tercer proceso se conoce como *respiración endógena* y se corresponde con la siguiente reacción.



La complejidad de estas reacciones hace que éstas se puedan ver favorecidas o inhibidas por agentes externos. Los principales factores que pueden afectar al proceso de oxidación biológica y se deben controlar son:

- a) *Características físico-químicas del agua residual*: determinarán el mejor o peor desarrollo de los microorganismos. Existen compuestos contaminantes que son biodegradables y otros que no lo son, por ello la biodegradabilidad del agua residual condiciona el rendimiento del tratamiento de depuración biológico.

- b) *Nutrientes*: son elementos que se encuentran en bajas concentraciones, tales como N, P, S, Ca, Mg, etc., pero que son fundamentales para el desarrollo de la síntesis biológica. Los microorganismos necesitan por cada gramo de C, 0.043 g de N y 0.006 g de P. En el caso de las aguas residuales urbanas los nutrientes se encuentran en cantidades suficientes, pero en determinadas aguas industriales es necesaria su adición para poder realizar una depuración biológica.
- c) *Oxígeno*: es necesario su aporte para que se lleven a cabo las reacciones biológicas en medio aerobio.
- d) *Temperatura*: a medida que se incrementa la temperatura (hasta los 37°C) aumenta la velocidad con la que los microorganismos degradan la materia orgánica.
- e) *pH*: se debe controlar, ya que puede inhibir el desarrollo de los microorganismos a pH mayores de 9.5 o inferiores a 5.
- f) *Salinidad*: el alto contenido en sales disueltas requiere de un tiempo de adaptación de los microorganismos y condiciona el tipo de bacterias presentes.
- g) *Compuestos tóxicos o inhibidores*: existen ciertas sustancias que a determinadas concentraciones inhiben el proceso biológico. Como por ejemplo los metales pesados.

1.1.2. Clasificación de los microorganismos presentes en un proceso de fangos activos

En un proceso de fangos activos los microorganismos que se desarrollan en el proceso biológico son los que llevan a cabo la depuración del agua residual. Estos microorganismos se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios. En función del nivel de desarrollo de los mismos se dividen en:

Introducción

- *Organismos procariotas*: son los menos desarrollados. Su célula es muy sencilla y se caracteriza por carecer de membrana nuclear, por lo que el núcleo es difuso y el material genético se encuentra libre en el citoplasma. Constituyen organismos unicelulares como las bacterias.
- *Organismos eucariotas*: son más evolucionados y de mayor complejidad. Se caracterizan por poseer los órganos de las células protegidos por una membrana nuclear. La célula puede construir organismos unicelulares y pluricelulares. Los protozoos, hongos, animales y plantas son organismos eucariotas.

En el proceso de fangos activos los principales microorganismos que se encuentran son los siguientes:

- *Bacterias*: responsables de la estabilización de la materia orgánica y de la formación de flóculos.
- *Protozoos*: son considerados como bioindicadores del estado de funcionamiento del proceso de depuración. Son los principales consumidores de bacterias.
- *Metazoos*: son organismos aerobios pluricelulares. Se pueden encontrar rotíferos y nemátodos. Suelen ser indicativos de edades del fango y tiempos de retención elevados.
- *Virus*: Los virus son más pequeños que las bacterias. Necesitan otras células vivas para poder multiplicarse.
- *Hongos*.
- *Pequeños invertebrados inferiores*.

Las bacterias, hongos y algunos protozoos flagelados son microorganismos principalmente descomponedores de materia orgánica.

Mientras que los protozoos y metazoos (rotíferos y nematodos) son microorganismos consumidores de materia orgánica.

1.2. PARÁMETROS QUE DEFINEN EL PROCESO BIOLÓGICO

La *carga másica* (C_m) se define como la relación existente entre la cantidad de microorganismos presentes en el reactor (expresada como la concentración de sólidos en suspensión volátiles en el licor de mezcla) y la materia orgánica presente en el agua residual (expresada como la DBO₅ o DQO que entra en el reactor al día). La concentración de biomasa es inversamente proporcional, por lo que cuando se opera con altas concentraciones de biomasa la relación alimento/microorganismos disminuye. Se calcula mediante la (Ec. I.1).

$$C_m = \frac{Q \cdot DBO_5}{V \cdot SSVLM} \quad (Ec. I.1)$$

Donde, Q es el caudal de entrada (m³/d), DBO₅ es la demanda biológica de oxígeno en el influente (mg/L), V es el volumen del reactor (m³) y SSVLM la concentración de sólidos volátiles en el reactor (mg/L).

El *tiempo de retención hidráulico* (TRH) representa el tiempo de permanencia de la biomasa en el reactor. Se calcula según la (Ec. I.2).

$$TRH = \frac{V}{Q} \quad (Ec. I.2)$$

Donde, V es el volumen del reactor (m³) y Q el caudal de entrada (m³/d).

Largos tiempos de retención hidráulicos provocan una menor producción de fangos, favoreciéndose el proceso de respiración endógena.

La *edad del fango* (θ) representa la relación entre los fangos presentes en el reactor biológico y los fangos en exceso eliminados de la instalación

diariamente. Este parámetro da una idea acerca del tiempo de retención de los microorganismos en la instalación. Se determina mediante la (Ec. 1.3).

$$\theta = \frac{V \cdot SSLM}{Q_w \cdot SS_w + Q_s \cdot SS_s} \quad (Ec. 1.3)$$

Donde, Q_w es el caudal de fango purgado (m^3/d), SS_w es la concentración de microorganismos en el fango purgado (mg/L), Q_s es el caudal del efluente (m^3/d) y SS_s es la concentración de microorganismos en el efluente (mg/L).

2. TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS

2.1. INTRODUCCIÓN A LOS PROCESOS DE MEMBRANA

Una membrana es una barrera semipermeable que permite el paso selectivo de sustancias a través de ella. El proceso de separación de fases tiene lugar debido a la existencia de una fuerza impulsora, principalmente la presión, concentración o potencial eléctrico. La selectividad de la membrana permitirá enriquecer o empobrecer una corriente en una o varias sustancias.

A diferencia de los procesos de filtración convencional, en los procesos de separación con membranas la corriente a tratar, *alimento*, fluye de forma tangencial a lo largo de la superficie de la membrana, generándose dos corrientes, una llamada *permeado*, que es la fracción del alimento capaz de atravesar la membrana y otra llamada *rechazo* o *concentrado*, que es la fracción que no es capaz de atravesar los poros de la membrana y contiene los solutos rechazados por la misma. El esquema se muestra en la Figura 1.2.

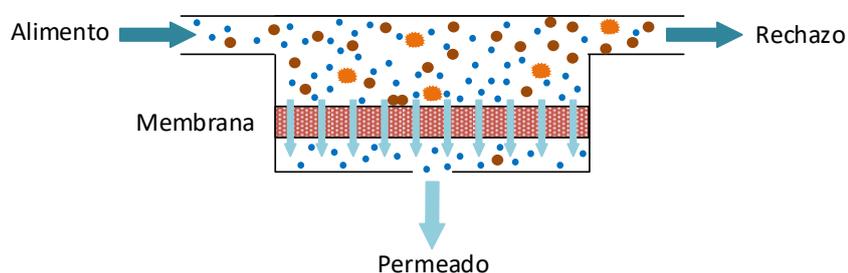


Figura I.2: Esquema de funcionamiento de una membrana

La filtración tangencial permite mantener una velocidad elevada de filtración, generando turbulencias, que evita que las partículas se depositen sobre la superficie de la membrana formándose una torta, que dificultaría el paso a través de la misma.

Las membranas cuya fuerza impulsora es el gradiente de presión entre el alimento y el permeado se clasifican en: Ósmosis Inversa (OI), Nanofiltración (NF), Microfiltración (MF) y Ultrafiltración (UF). Cuando se requiere la eliminación de sales del agua se utiliza la OI (monovalentes) y la NF (multivalentes). Si lo que se necesita es retirar partículas de mayor tamaño, se utiliza la UF y MF (Tabla I.1).

Tabla I.1: Clasificación de los procesos de membrana cuya fuerza impulsora es la presión

Tipo de filtración	Tamaño de poro	Contaminantes eliminados	Presión operación
MF	0.1-10 μm	Sólidos suspendidos, bacterias, protozoos	0.1-2 bar
UF	0.003-0.1 μm	Coloides, proteínas, polisacáridos, bacterias, virus	1-5 bar (flujo cruzado) 0.2-0.3 bar (sumergida)
NF	< 0.001 μm	Virus, materia orgánica, iones multivalentes	5-20 bar
OI	< 0.0001 μm	Impurezas, iones monovalentes	10-100 bar

La diferencia de presión entre el alimento y el permeado se denomina *presión transmembranal* (PTM) y se determina como la media de la presión de la corriente de entrada y rechazo, menos la presión de la corriente de permeado, que suele ser la atmosférica [5].

2.2. MATERIALES DE MEMBRANA

Según el material del que está fabricada la membrana, éstas se pueden clasificar en membranas orgánicas e inorgánicas.

Membranas orgánicas

Los polímeros utilizados en la fabricación de membranas orgánicas son muy diversos y su utilización depende de la aplicación posterior que vayan a tener, ya que determinan factores tan importantes como la resistencia mecánica, química y térmica.

Si se fabrican con materiales altamente polares, con alta afinidad al agua, como las poliamidas, serán hidrofílicas. Si en cambio se fabrican con materiales apolares, con baja afinidad por el agua, como el polietileno, serán hidrofóbicas. Los materiales poliméricos comúnmente utilizados son: Polisulfona (PSU), Acetato de celulosa (AC), Poliamidas aromáticas (PA), Poliácilonitrilo (PAN), Fluoruro de polivinilideno (PVDF), Poliéter sulfona (PES), Polipropileno (PP) o Polietileno clorado (PEC), entre otros.

Membranas inorgánicas

Las membranas inorgánicas están compuestas principalmente por óxidos de titanio, circonio y aluminio.

El uso de este tipo de membranas es más reciente y ofrecen numerosas ventajas, entre las que cabe destacar su larga vida útil. Sirven para tratar aguas residuales con pH extremos y tienen una gran resistencia térmica y mecánica. Su configuración puede ser tanto tubular como plana. Generalmente, están compuestas por una capa soporte de alúmina y una capa selectiva de ZrO_2 o Al_2O_3 . El inconveniente de estas membranas es su

elevado coste, que hace que se utilicen para aplicaciones en las que se requiere elevada resistencia química o térmica.

2.3. PARÁMETROS QUE DEFINEN EL COMPORTAMIENTO DE LA MEMBRANA

La permeabilidad de una membrana se mide a partir de la *densidad de flujo de permeado* o *flux* (J_p), que se define como el volumen de permeado que atraviesa la membrana por unidad de área y unidad de tiempo. Es directamente proporcional a la fuerza impulsora, la presión.

La densidad de flujo de permeado se puede describir mediante la ecuación de Darcy (Ec. I.4):

$$J_p = K \cdot (PTM - \Delta\pi) \quad (\text{Ec. I.4})$$

Donde K es el coeficiente de permeabilidad de la membrana (expresado en $L/m^2 \cdot h \cdot \text{bar}$), PTM la presión transmembranal (expresada en bar) y $\Delta\pi$ el gradiente de presión osmótica a través de la membrana. En los procesos de MF y UF las presiones osmóticas involucradas son bajas, luego este factor se considera despreciable, quedando la ecuación resumida a la siguiente (Ec. I.5).

$$J_p = K \cdot PTM \quad (\text{Ec. I.5})$$

La *selectividad* de la membrana es la facilidad que tiene para separar unos componentes de otros, se expresa mediante el *índice de rechazo* (R), que mide la fracción de soluto que pasa a través de ellas (Ec. I.6).

$$R (\%) = \left(\frac{C_A - C_P}{C_A} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. I.6})$$

Siendo C_A la concentración de soluto a en el alimento y C_P la concentración de soluto a en el permeado.

En el caso de los procesos de UF y MF el factor crítico que determina la retención de solutos es el tamaño de molécula [6]. Otros parámetros que pueden afectar a la selectividad son el material de membrana, los parámetros de operación y los efectos del ensuciamiento [5].

2.4. MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN Y ULTRAFILTACIÓN

La microfiltración y la ultrafiltración se pueden considerar procesos de membrana a baja presión. La MF se utiliza para la eliminación de partículas entre 0.05 y 10 μm , mientras que la UF retiene moléculas de menor tamaño, del rango de 2-100 nm, como son coloides, proteínas y azúcares [7].

Las membranas de MF se caracterizan por tener un tamaño de poro determinado, por lo que para expresar el tamaño de los solutos que son rechazados por la membrana se utiliza el tamaño nominal de poro en micras. En cambio, para describir el tamaño de las sustancias que separa una membrana de UF se emplea generalmente el denominado umbral de corte molecular, conocido con la palabra inglesa *cut-off*, el cual se expresa en Daltons (g/mol). Este concepto se refiere al peso molecular de soluto rechazado por la membrana. Una membrana de UF presenta cortes moleculares de 3.000 a 300.000 Daltons, con tamaños de poro entre 0.003 y 0.1 μm aproximadamente, mientras que las membranas de MF presentan un tamaño de poro entre 0.1 y 10 μm .

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

Las membranas de MF y UF son las utilizadas en los biorreactores de membranas (MBR).

2.5. ENSUCIAMIENTO DE LAS MEMBRANAS

El principal problema de los procesos de membranas es el ensuciamiento de las mismas, el cual provoca un descenso del flujo de permeado. El ensuciamiento, llamado en inglés *fouling*, consiste en la adsorción y deposición sobre la membrana de diferentes elementos presentes en el agua. El mecanismo de este proceso es consecuencia de la interacción fisicoquímica de estos elementos con la membrana. Dependiendo de los grupos funcionales que forman las moléculas del agua a tratar y la membrana, las interacciones pueden ser de tres tipos: fuerzas de Van der Waals, fuerzas de atracción electrostáticas o adhesión por enlace químico [8].

A su vez, el ensuciamiento de la membrana puede ser causado por precipitación de compuestos inorgánicos, por compuestos orgánicos de elevado peso molecular (como son los ácidos húmicos o proteínas) y/o ensuciamiento biológico o *biofouling*. El *biofouling* se debe al crecimiento de bacterias y otros microorganismos sobre la superficie de la membrana formando una biopelícula o *biofilm*.

En el caso de la depuración biológica, los compuestos que suelen producir el *biofouling* son las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, del inglés *extracellular polymeric substances*) que son metabolitos excretados por la biomasa o generados a partir de la lisis celular. Las EPS están formadas principalmente por proteínas, carbohidratos, compuestos húmicos y ácidos nucleicos, formando una matriz tridimensional que actúa como mecanismo de unión entre los constituyentes del flóculo [9]. Esta unión se lleva a cabo mediante fuerzas electrostáticas.

Debido a las interacciones físico-químicas y microbianas, como son la producción de EPS y el fenómeno conocido como percepción de cuórum o autoinducción (en inglés *quorum sensing*), se forman bioagregados. Estos bioagregados influyen en el ensuciamiento de las membranas [10].

Introducción

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo de comunicación célula a célula, en el que las bacterias secretan y perciben productos químicos específicos (inductores), regulando la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular [11] (Hyang, 2016). Las bacterias Gram-negativas usan acil-homoserina lactonas (AHL) como inductores. Hyang et al. (2016) demostraron estas bacterias tienen un papel importante en la formación de biofilm y producción de EPS [11].

Yu et al. (2016) estudiaron el efecto de la edad del fango en el ensuciamiento de las membranas de un MBR desde el punto de vista del *quorum sensing*. Para ello, trabajaron con una edad del fango de 4, 10 y 40 días. Llegaron a la conclusión de que al aumentar la edad del fango disminuían las bacterias promotoras de QS, así como también la concentración de productos solubles microbianos (SMP) y EPS, reduciéndose por tanto el bioensuciamiento de la membrana [12]. Se puede afirmar que el *quorum sensing* representa una nueva perspectiva en la investigación en el campo del ensuciamiento de las membranas.

Con el fin de minimizar el ensuciamiento, es posible llevar a cabo diferentes operaciones, como por ejemplo realizar un buen pretratamiento al agua a tratar, optimizar las condiciones de operación o seleccionar una membrana adecuada.

Cabe destacar que existen dos tipos diferenciados de *fouling*:

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

El *fouling* reversible se elimina fácilmente mediante mecanismos de limpieza físicos, en cambio la eliminación del *fouling* irreversible es más compleja y conlleva la realización de limpiezas químicas agresivas e incluso la sustitución de membranas.

Como consecuencia del ensuciamiento de las membranas se reduce el flujo de permeado y se incrementa el gasto energético, ya que para mantener el flujo de permeado constante, se ha de aplicar una mayor presión transmembranal.

Los fenómenos que originan el ensuciamiento pueden ser:

a. *Precipitación sobre la superficie de la membrana*: Consiste en la precipitación de partículas de soluto sobre la superficie de la membrana, de manera que los poros quedan tapados (Figura I.3a).

b. *Obtención del poro*: Puede ocurrir que una partícula quede atrapada a lo largo del poro, de manera que impida el paso a través del mismo (Figura I.3b).

c. *Constricción del poro por adsorción en las paredes*: la adsorción de partículas causa la reducción efectiva del tamaño de poro, de modo que se reduce el flux de permeado (Figura I.3c).

d. *Obtención del poro por un agregado*: Puede ocurrir que la obtención del poro se efectúe por acción de un agregado de partículas (Figura I.3d).

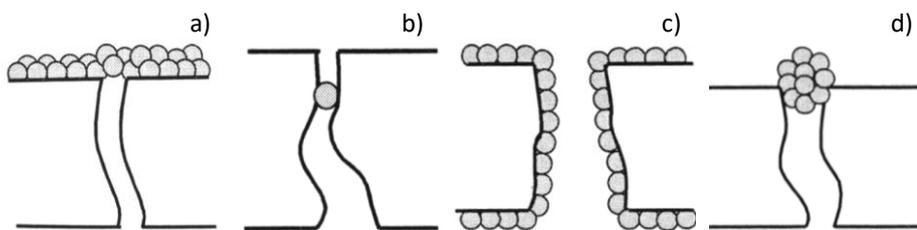


Figura I.3: Ensuciamiento por bloqueo de poro: precipitación (a), obtención del poro (b), Constricción del poro (c) y formación de agregado (d)

2.5.1. Polarización por concentración

El fenómeno de polarización por concentración tiene lugar en aquellos procesos que operan de forma tangencial. En las condiciones de trabajo de

Introducción

estos procesos es difícil evitar que los componentes de la alimentación rechazados por la membrana se acumulen en su superficie.

El resultado es la creación de gradientes de concentración (polarización de la concentración) en el lado de la alimentación, que pueden disminuir la eficiencia de separación de la membrana y el flujo de permeado [7].

La Figura I.4 representa la situación en la que un componente i del alimento, que es rechazado por la membrana, se acumula en su superficie, creándose un gradiente de concentración localizado en una película de espesor δ , próximo a la membrana. Esta película se conoce como *capa gel*.

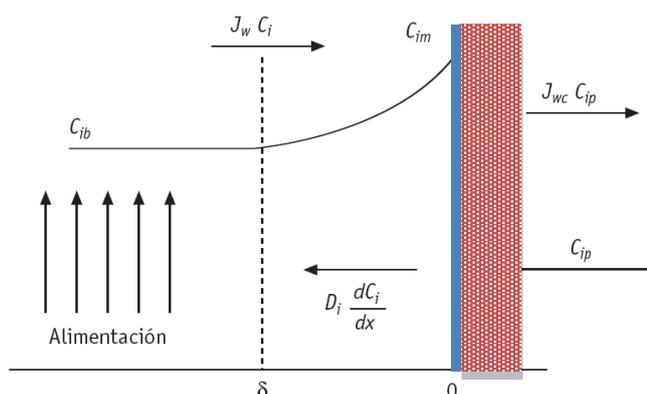


Figura I.4: Fenómeno de polarización por concentración

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

Una polarización de la concentración elevada aumenta la presión osmótica en el lado de la alimentación, contribuyendo a la disminución del flujo de permeado. Además, si la concentración C_{im} es elevada se favorecerá la difusión del componente i a través de la membrana, lo que se traduce en una disminución del coeficiente de rechazo [5].

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

3. BIORREACTOR DE MEMBRANAS (MBR)

El biorreactor de membranas, conocido como MBR por sus siglas en inglés *Membrane Bioreactor*, es una tecnología que combina el tratamiento biológico con un sistema de membranas de ultrafiltración o microfiltración [13].

En el campo del tratamiento de aguas residuales, la tecnología de membranas estaba limitada hasta hacer poco a tratamientos de afino o sistemas terciarios. Estos tratamientos se aplicaban exclusivamente en aquellos casos donde los requerimientos de vertido eran muy rigurosos o se pretendía reutilizar el agua depurada, ya que los factores principales que limitaban su uso eran el elevado coste de inversión y de operación. Actualmente, el desarrollo de módulos de membrana menos costosos y más efectivos, junto con el endurecimiento de los requisitos de vertido, han permitido la extensión de la aplicación de los procesos de membrana y, de forma concreta, en la depuración de las aguas residuales en el tratamiento secundario a través de los MBR.

El proceso MBR es un proceso biológico donde la membrana actúa como una barrera física entre la biomasa presente en la zona donde se produce la degradación biológica de la materia orgánica y contaminantes, y el agua tratada. De este modo, se evita tener un decantador secundario, a continuación del reactor biológico. La acción de las membranas garantiza un efluente de alta calidad favoreciendo las condiciones necesarias para su reutilización, ya que retiene los sólidos en suspensión, coloides, bacterias y gran parte de virus. Esta es su principal ventaja frente a los procesos

Introducción

convencionales de tratamiento de aguas residuales, ya que el efluente obtenido puede ser reutilizado directamente, por ejemplo en agricultura.

El agua filtrada, denominada permeado, constituye el agua tratada, mientras que el rechazo de la membrana, la biomasa, permanece en el reactor formando el licor de mezcla. Una vez se alcanza la concentración de sólidos en el licor de mezcla considerada máxima, se realiza la purga de fangos para mantener el régimen estacionario de operación.

Con el fin de provocar alta turbulencia en las proximidades a la superficie filtrante de las membranas, y reducir así la velocidad de ensuciamiento de las mismas, en el fondo del tanque se colocan unos difusores de aire que proporcionan un flujo de aire en forma de burbuja gruesa, en régimen continuo o intermitente.

Cabe destacar que en los procesos MBR no se da el problema de la sedimentabilidad de la biomasa que se podía dar en el decantador de fangos activos convencional. Por ello, en este tipo de tratamiento se puede trabajar con una concentración alta de biomasa, lo que hace que el sistema sea más compacto y además, más efectivo en la eliminación de materia orgánica. Sin embargo, se debe controlar la concentración de sólidos en el licor de mezcla para prevenir problemas que podrían aparecer, tales como la limitación en la transferencia de oxígeno, el incremento de la viscosidad del licor de mezcla, los cambios en los mecanismos de ensuciamiento de las membranas, etc.

Además, en los MBR se puede llevar a cabo el proceso de eliminación de nutrientes (especialmente nitrógeno) por vía biológica en una sola etapa, de forma que incrementando el tiempo de residencia celular en el reactor se consigue eliminar simultáneamente la materia orgánica biodegradable y la nitrificación del nitrógeno amoniacal. La recirculación del licor de mezcla hacia una zona anóxica del reactor biológico permite realizar el proceso de desnitrificación. De esta forma, el permeado estará libre de materia orgánica y de nitrógeno [14].

El inconveniente principal de los procesos MBR radica en el ensuciamiento de las membranas durante la filtración, fenómeno todavía pendiente de resolver, pues los mecanismos que se dan son muy complejos [15].

3.1. EVOLUCIÓN DE LOS BIORREACTORES DE MEMBRANA

La investigación y la comercialización de los biorreactores de membrana se inició en los años 70, cuando se empezó a considerar la combinación de la tecnología de membranas con el proceso biológico como un sistema óptimo para el tratamiento de las aguas residuales [14].

La idea de sustituir el decantador secundario por un proceso de UF dentro del proceso convencional de fangos activados se le atribuye a Smith et al. (1969) [16]. Otra de las primeras aportaciones fue la de Hardt et al. (1970), quien utilizó un biorreactor aerobio de laboratorio con una membrana de UF para tratar agua residual sintética [17].

El primer MBR desarrollado comercialmente fue llevado a cabo por la compañía Dorr-Oliver quien desarrolló un sistema para el tratamiento de aguas residuales llamado Membrane Sewage Treatment (MST) [18]. En el sistema MST el agua residual entraba en un reactor convencional de fangos activos, desde donde se enviaba de forma continua a un módulo de ultrafiltración externo con membranas planas.

En la década de los 70 la tecnología entró por primera vez en el mercado japonés gracias a un acuerdo entre las compañías Dorr-Oliver y Sanki Engineering. La primera generación de MBR fue operada con membranas orgánicas colocadas externamente al reactor biológico, en las que se bombeaba la biomasa del reactor a un módulo de membranas. A principios de los 90 surgió la idea de introducir el módulo dentro del reactor biológico, simplificando así el proceso [19].

Entre los años 80 y 90, el gobierno Japonés impulsó la reutilización de aguas, invirtiendo en el desarrollo de un sistema compacto y que produjese

Introducción

un efluente de elevada calidad, fue entonces cuando se desarrolló el primer MBR con membranas de UF de fibra hueca [19]. También se desarrollaron las membranas planas de MF de la compañía Kubota, las cuales podían estar sumergidas en el biorreactor.

De forma paralela en aquella década, Thetford Systems (EEUU), actualmente parte de Zenon Environment, lanzó su versión de un MBR externo (proceso *Cycle-Let*) para el tratamiento aeróbico de las aguas residuales.

A finales del año 1996, en Japón existían más de sesenta biorreactores de membrana, con membranas Kubota, de configuración externa para diversas aplicaciones tanto para el tratamiento de aguas urbanas como industriales [13]. La primera planta MBR europea se instaló en 1998 en Porlock (Gran Bretaña) con membranas planas de MF de Kubota, diseñada para 3.800 habitantes.

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

En los últimos años, el número de MBR instalados ha aumentado considerablemente. Cabe destacar que en Suecia y Singapur se están construyendo plantas para el tratamiento de 800.000 m³/d con tecnología MBR y se prevé que estén funcionando entre 2025 y 2026 [20].

En España, con el aumento de las necesidades de agua en zonas con escasez de agua, el endurecimiento de las legislaciones de vertido, las necesidades de realizar ampliaciones en EDAR con escaso terreno y la bajada del precio de las membranas y los costes de operación, han hecho que los MBR adquieran un papel importante en la reutilización de aguas depuradas [14]. La implantación de los primeros MBR urbanos se realizó en 2002 y desde ahí se ha ido incrementando exponencialmente, pasando de 13 instalaciones de menos de 5000 m³/d en el 2006 a más de 55

instalaciones en 2012, seis de ellas con capacidad entre 15000 – 35000 m³/d [14].

La mayor ventaja potencial de esta tecnología está en el campo de la reutilización. El uso del agua depurada en España supone un 12% de la demanda nacional. El Plan Hidrológico Nacional incluye proyectos de reutilización de aguas residuales que actualmente son vertidas al mar, gracias a los cuales, se prevé conseguir aumentar el uso actual de los MBR. Por otro lado, la Unión Europea está trabajando en el borrador de una nueva Directiva Europea (borrador v3.2, Diciembre 2017) para fijar el desarrollo de los mínimos criterios de calidad para reutilización de aguas en agricultura y recarga de acuíferos.

Por todo ello, la investigación en el campo de los MBR está en continuo desarrollo dado el interés comercial suscitado. Por lo que es de prever que la tendencia continuará en el futuro y que el número de biorreactores de membranas sufrirá un incremento importante.

3.2. VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL PROCESO MBR

El objetivo de este apartado es comentar las ventajas y los inconvenientes que presentan los procesos MBR en comparación con otros procesos biológicos. El MBR ofrece las siguientes ventajas:

1. Mayor calidad del agua tratada:

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

2. Flexibilidad de operación:

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

3. Posibilidad de operar con altas concentraciones de biomasa:

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

4. Tamaño compacto de la planta:

El proceso MBR típicamente opera concentraciones de sólidos suspendidos en el licor de mezcla (SSLM) entre 8.000 y 12.000 mg/L, que son considerablemente mayores que en procesos de fangos activos convencionales. La elevada concentración de SSLM permite que valores convencionales de carga orgánica puedan ser alcanzados con tiempos de residencia hidráulica inferiores. Además, hay un ahorro muy importante en espacio puesto que se elimina el decantador secundario y el tratamiento terciario para llegar a una misma calidad del agua tratada que en sistemas convencionales seguidos de un proceso terciario.

5. Capacidad de ampliación:

La tecnología MBR es de naturaleza modular y por lo tanto, permite la ampliación de la planta.

6. Baja producción de fangos:

Las altas edades del fango frecuentemente utilizadas en los MBR explican la baja producción de fango. Esta reducción de fango con respecto

a los procesos convencionales deriva también en una disminución en los costes de tratamiento del fango.

7. Bajos requerimientos de mano de obra:

Los tratamientos con MBR tienen la capacidad de funcionar correctamente sin la necesidad de que los operarios estén continuamente vigilando.

8. Fiabilidad del proceso:

Debido a que los MBR trabajan con valores muy bajos de carga orgánica, y la membrana constituye una barrera para la descarga de partículas, la calidad del efluente de un MBR no depende de las variaciones de caudal o carga contaminante que pueden afectar negativamente a la calidad de efluente en el proceso convencional.

Por el contrario, el MBR ofrece las siguientes desventajas:

1. Costes:

Las principales limitaciones de la tecnología MBR tienen principalmente carácter económico ya que requiere una inversión inicial importante debido al todavía elevado precio de las membranas pese haberse reducido en los últimos años. Además, para lograr las presiones requeridas de operación en el sistema, estos tratamientos conllevan un gasto energético elevado, el cual se ve incrementado en el caso de los MBR con configuración externa debido a la recirculación de la biomasa. Además, deben añadirse los gastos procedentes de la limpieza de las membranas, por lo que esta tecnología lleva implícitos elevados costes de implantación y explotación.

2. Ensuciamiento de las membranas:

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

tiempo las membranas no se recuperan tras la limpieza y deben ser reemplazadas por nuevas.

3. Tratamiento de fangos más complicado:

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

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

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

3.3. CONFIGURACIÓN DEL BIORREACTOR DE MEMBRANAS

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

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

- *Biorreactores con membrana sumergida:*

En esta configuración la unidad de membranas está inmersa en el reactor biológico (Figura I.5). La fuerza impulsora a través de la membrana se alcanza presurizando el biorreactor o creando presión negativa en el lado del permeado mediante la aspiración a través de la propia membrana.

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

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

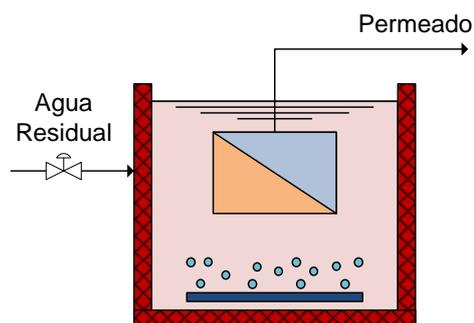


Figura I.5: Configuración MBR con membrana sumergida

- *Biorreactores con membrana externa:*

Esta configuración (Figura I.6) implica que el licor de mezcla es recirculado desde el biorreactor hasta la unidad de membranas que se encuentra en el exterior de reactor biológico. La fuerza impulsora es la presión creada por el bombeo hacia el módulo, siendo muy elevada la velocidad tangencial a la membrana.

Introducción

La ventaja de los MBR con membranas externas radica en que facilitan su operación, al poderse manipular los tanques independientemente. De este modo se pueden manipular las membranas sin influir en el reactor (realizar limpiezas químicas, mantenimiento, etc.) y se puede vaciar el reactor sin peligro de dañar las membranas.

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

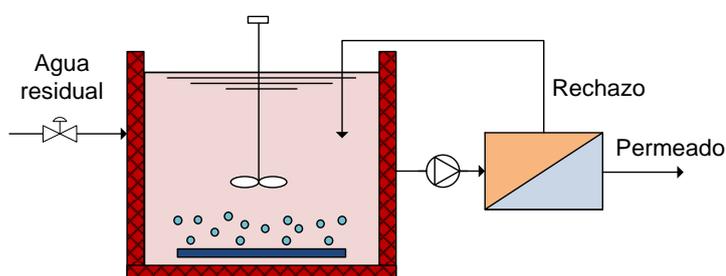


Figura 1.6: Configuración MBR con membrana externa

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

Para comparar ambos tipos de configuración, en primer lugar se compara la presión de trabajo. En el caso de los biorreactores con membrana sumergida, el rango de PTM a la que se trabaja es menor que en el caso de reactores con configuración externa, pudiéndose trabajar en rangos de presión del orden de 0.05 bares a 0.5 bares, mientras que en los de configuración externa, la PTM suelen estar entre los 0.5 y 5 bares. Así pues, en cuanto a este factor, los biorreactores de membrana sumergida tienen una ventaja importante, ya que al trabajar en rangos de menor presión, los costes de operación se reducen, y al mismo tiempo, y puesto que el estrés mecánico al que están expuestas las membranas es menor, aumenta su vida útil.

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

El consumo de energía es debido a los requerimientos de potencia del proceso, causados por el bombeo del agua de alimentación, la aireación, la succión de permeado y la recirculación. El consumo de energía para módulos de membrana externa es de 2-10 KWh/m³, mientras que para las sumergidas es de 0,2-0,4 KWh/m³ [21]. Las razones económicas son las que justifican mayormente que se estén imponiendo los sistemas de membranas sumergidas.

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

Por todo ello, la mayoría de los MBR actuales tienen las membranas sumergidas en el reactor [13]. En la Tabla I.2 se recoge a modo de resumen, la comparación entre ambas configuraciones.

Introducción

Tabla 1.2: Comparación entre configuración de MBR con membranas sumergidas y externas

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

3.4. CONFIGURACIÓN DE LAS MEMBRANAS DEL MBR

Las configuraciones de las membranas utilizadas comúnmente en los MBR sumergidos son de dos tipos: membranas planas y de fibra hueca.

- *Membranas planas:*

Estas membranas ofrecen un mejor flujo tangencial a lo largo de la membrana, una relación superficie de membrana/volumen baja y por lo general no es posible un contralavado (aunque el fabricante Microdyn Nadir GmbH sí comercializa membranas contralavables). Las membranas se disponen en bastidores separados por placas. La alimentación impulsada al crear una depresión en el lado de permeado, circula por los espacios placa-membrana, concentrándose en contaminantes conforme avanza el flujo de permeado a través de las paredes de las membranas. Estos sistemas presentan la desventaja de no proporcionar una gran superficie de membrana por unidad de volumen de módulo. Por contra, tienen la ventaja de poder ser montados y desmontados fácilmente. Las membranas planas más ampliamente extendidas son las de Kubota.

- *Membranas de fibra hueca:*

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

Necesitan un ligero vacío para conseguir la filtración. A medida que se extrae el permeado, la fibra aumenta su resistencia al paso de líquido debido a su ensuciamiento, por lo que para mantener el caudal de permeado es necesario aumentar el vacío hasta alcanzar el límite mecánico que soporta la propia membrana.

Cada módulo de membranas está formado por miles de fibras, dispuestas verticalmente, y unidas por sus extremos a dos cabezales plásticas, en el caso de las membranas de Zenon, y unidas sólo por la parte inferior en el caso de las de Koch. Estas últimas pueden moverse libremente de modo que los residuos acumulados pueden desprenderse gracias al burbujeo.

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

- *Membranas tubulares:*

Estas membranas se utilizan en aquellos casos en los que el MBR tiene una configuración con membranas externas, generalmente MBR que tratan efluentes industriales, donde una parte del agua se filtra, mientras que la otra se recircula al reactor. Este tipo de membranas necesitan ser lavadas a contracorriente.

En la Tabla I.3, se recoge un resumen de los dos tipos de configuraciones más ampliamente utilizados.

Introducción

Tabla I.3: Comparación entre configuración de membranas de fibra hueca y planas en MBR

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

3.5. LIMPIEZA DE LAS MEMBRANAS

En el caso de membranas sumergidas con configuración de fibra hueca y de las membranas planas contralavables (por ejemplo, Microdyn Nadir o membranas cerámicas), con el fin de reducir la velocidad de ensuciamiento de la membrana se recurre a procesos de limpieza mecánica a través de un lavado que se realiza invirtiendo la dirección del flujo de permeado (contralavado), durante cortos periodos de tiempo. De esta forma, se elimina la capa externa depositada sobre la membrana y parte de las partículas que se han introducido en sus poros. En la Figura I.7 se muestra un esquema de este tipo de limpieza.

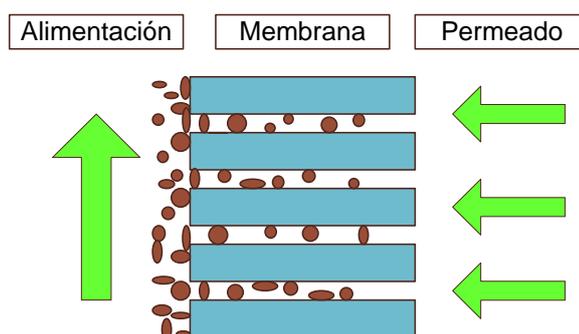


Figura I.7: Esquema de limpieza de membranas con contralavado

Como se ha comentado anteriormente, con objeto de provocar alta turbulencia en las proximidades a la superficie filtrante, y reducir así la velocidad de ensuciamiento, se introduce bajo de cada módulo de membranas un flujo de aire en forma de burbuja gruesa. (Figura I.8).

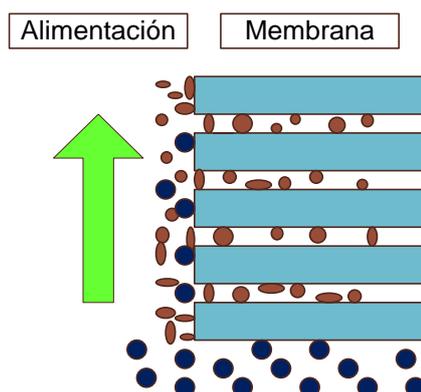


Figura I.8: Esquema de limpieza de membranas mediante la aireación

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

3.6. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA EN EL FUNCIONAMIENTO DEL MBR

Tal y como se ha comentado anteriormente, el proceso de MBR se divide en dos etapas: una degradación biológica de la materia orgánica y una filtración por membranas. Cada una de estas etapas puede considerarse y tratarse de forma independiente, pero hay que tener en cuenta que el conjunto de las dos influirá en los parámetros de diseño. Al igual que en el proceso convencional de fangos activos, el agua residual se

Introducción

introduce en el reactor, donde se mantiene un cultivo de microorganismos que se encarga de la degradación de la materia orgánica.

Los parámetros de diseño son los mismos que se emplean en un proceso convencional de fangos activos: la carga másica, la edad del fango, y el tiempo de retención hidráulica (TRH), descritos anteriormente en el punto 1.2.

En los MBR, los microorganismos emplean la materia orgánica principalmente para proveerse de energía para su mantenimiento básico, en lugar de emplearla para su crecimiento.

Un estudio realizado por Cicek et al. (1997) constató la complejidad de la población microbiológica presente en los MBR, que tendría las siguientes características [22]:

- Flóculos pequeños (mientras que en un proceso convencional de fangos activos nos encontramos con flóculos de tamaños en torno a los 20 μm en un proceso MBR el tamaño medio está en torno a 3,5 μm).
- Gran número de bacterias libres nadadoras.
- Escasa presencia de organismos filamentosos o ciliados.
- Escasa presencia de nemátodos.

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

La baja producción de fango se consigue cuando toda la materia orgánica entrante es utilizada para el mantenimiento de la célula y no para su crecimiento. Además, el tamaño pequeño de flóculo (debido a las elevadas velocidades tangenciales) favorece la accesibilidad del oxígeno y la materia orgánica a los microorganismos, hecho que se traduce en un aumento de la actividad del sistema.

El estudio de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) ha aumentado considerablemente en los últimos 10 años [23–25]. Las investigaciones se han centrado principalmente en el estudio de su influencia en el ensuciamiento de las membranas, así como en determinar el método de extracción las eEPS de los flóculos y su cuantificación [26,27].

Las EPS están formadas por la suma de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) y los productos solubles microbianos (SMP). Forman parte de la capa exterior de las bacterias presentes en el agua residual y están formadas básicamente por proteínas y polisacáridos aunque también se encuentran en su composición, ácidos nucleicos, lípidos, ácidos húmicos, etc., los cuales pueden estar tanto dentro como fuera de la célula en forma de eEPS o SMP [13].

Las EPS inicialmente están asociadas a las células, siendo la fracción que se desprende de las mismas los productos solubles microbianos [28]. Ambos se acumulan sobre la superficie de la membrana durante la filtración, causando el ensuciamiento de la misma. Su comportamiento sobre la superficie de la membrana y el mecanismo de ensuciamiento de los MBR aún no está resuelto [15]. En la Figura I.9 se muestra el comportamiento de las EPS en el ensuciamiento de la membrana.

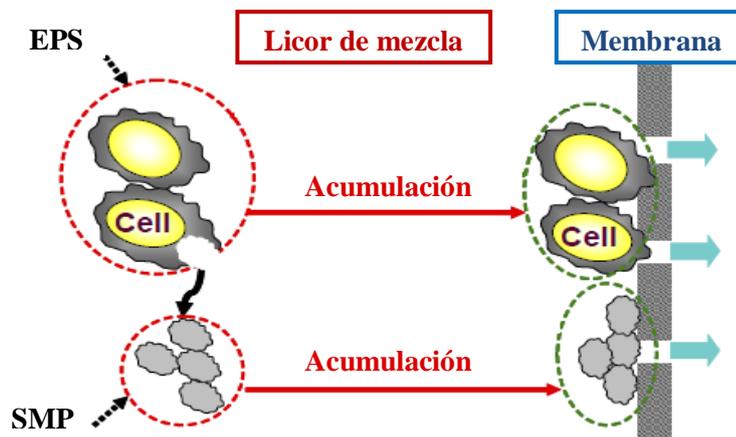


Figura I.9: Comportamiento de las EPS sobre la superficie de la membrana

Introducción

La mayoría de autores han identificado las EPS como uno de los factores biológicos más importantes causantes del *fouling* [29], en cambio hay otros que afirman que los SMP influyen más en el ensuciamiento [30–32].

Metzger et al., (2007) realizaron un estudio de caracterización de los biopolímeros depositados sobre la membrana de un MBR [33]. Tras una filtración fraccionaron las capas de ensuciamiento en capa superior, capa intermedia y capa inferior mediante enjuague, contralavado y limpieza química. Los resultados mostraron que la capa superior de ensuciamiento era una capa porosa, débilmente unida a la torta y con una composición similar a la de los flóculos, con SMP adheridos. Esta capa mostró el menor impacto a la resistencia al ensuciamiento de la membrana. La capa intermedia estaba formada por SMP, EPS y agregados bacterianos, con una elevada concentración de carbohidratos. La capa inferior representaba la fracción de ensuciamiento irreversible y tenía una elevada concentración de proteínas solubles (SMP) adheridas a la membrana.

Ahmed et al., (2007) afirman que las EPS, tanto las extraídas como las solubles, son el principal causante del ensuciamiento de las membranas en los MBR [34]. Estos autores comprobaron que, a medida que aumenta la concentración de EPS, aumenta la resistencia específica de la torta, lo que resulta en una reducción de flujo de permeado y un aumento de la presión transmembranal.

Además, las condiciones de operación como la edad del fango (θ), la carga másica (C_M), el tiempo de retención hidráulico (TRH) y la demanda de oxígeno no tienen ningún efecto directo sobre el ensuciamiento de la membrana, pero determinan las características del fango y como consecuencia, su variación puede modificar el fango activo [29] (Figura I.10).

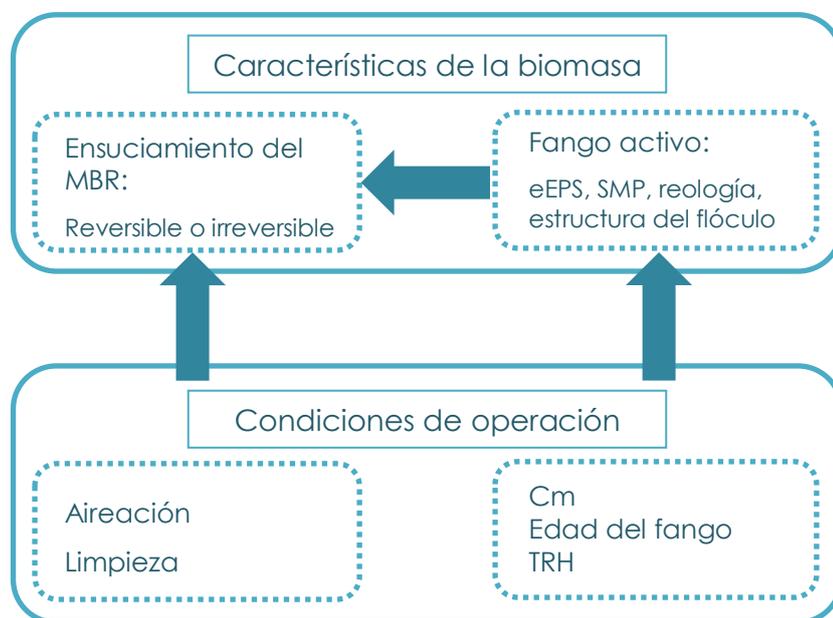


Figura I.10: Esquema de los parámetros que afectan al ensuciamiento de las membranas y métodos de control

La mayoría de los estudios se centran en encontrar los parámetros de operación adecuados para modificar las características del fango. Según Cho et al. la edad del fango es uno de los parámetros de operación más importantes que afectan el MBR, ya que una disminución del mismo hace aumentar la cantidad de EPS en los flóculos. Otros autores hacen la misma afirmación, así por ejemplo, Masse et al. (2006) obtuvieron que al aumentar la edad del fango de 10 a 53 días, la concentración de EPS disminuía de 45 - 70 mg/gSSV a 20 - 40 mg/gSSV [35]. Por lo que se concluye que edades del fango demasiado bajas pueden dañar la membrana, pero si se llegan a alcanzar edades muy elevadas también pueden causar un ensuciamiento excesivo, siendo la edad del fango óptima para el buen funcionamiento del MBR entre 20 – 40 d, dependiendo del tiempo de retención hidráulico y de las características de la alimentación.

El TRH y la carga orgánica son los principales parámetros de funcionamiento que afectan a la producción de EPS ya que rigen el

Introducción

crecimiento y la destrucción de la biomasa. Además, el TRH puede regir tanto la carga másica como la concentración de SSLM.

La intensidad de la aireación, el oxígeno disuelto y el tipo de alimentación también son parámetros importantes que afectan a las EPS. Las EPS causan que los flóculos estén unidos a la membrana, dificultando la eliminación de la torta depositada mediante la turbulencia creada con la aireación. Sin embargo, un aumento de la aireación excesivo puede provocar una disminución de la relación proteína/carbohidrato en las EPS. Esto es debido a que al aumentar la concentración de oxígeno disuelto, aumenta la tasa de crecimiento de los microorganismos, por lo que aumenta la concentración de biomasa, reduciéndose la concentración de carbohidratos, ya que estos son asimilados [36].

También se están realizando estudios en los últimos años que indican que el bulking filamentoso tiene una gran influencia en el ensuciamiento del MBR, ya que las bacterias filamentosas aumentan la concentración de SMP [37].

En la Figura I.11 se muestra un esquema de las estrategias que se proponen para el de control del ensuciamiento [29].

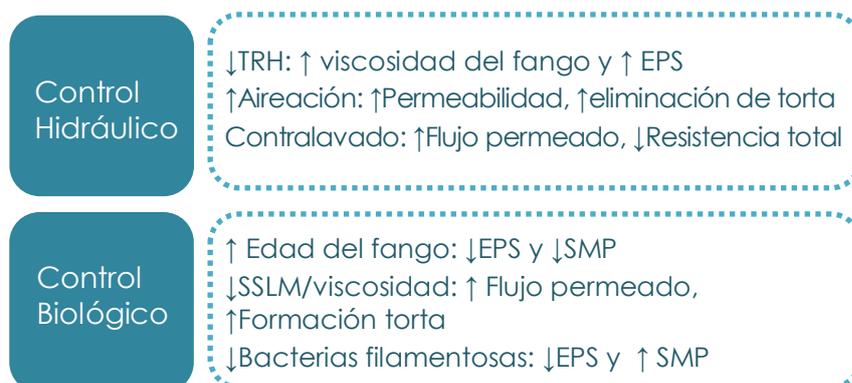


Figura I.11: Influencia de los parámetros de operación en el ensuciamiento de las membranas

Resumiendo, las condiciones de operación más favorables en un MBR, además de la aireación del tanque de membranas con difusores de burbuja gruesa y la realización de contralavados (si es posible), que reducen el ensuciamiento de las membranas son las siguientes:

- Valores elevados de: tiempo de retención hidráulico y edad del fango.
- Valores bajos de: EPS, SMP, SSLM, viscosidad, carga másica.

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

4. BIORREACTOR DE MEMBRANAS PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS

Los biorreactores de membrana están ampliamente implantados en depuradoras de aguas residuales urbanas, en cambio, también tienen un gran campo de aplicación en el tratamiento de aguas residuales industriales. En este caso se ha escogido la aplicación de la tecnología MBR al tratamiento de lixiviados procedentes de plantas de tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) [38].

Los lixiviados son unos líquidos muy contaminantes que se caracterizan por tener concentraciones muy elevadas de materia orgánica y amonio, entre otros. Debido a su alta carga contaminante, se deben aplicar procesos de alta eficiencia o combinación de diferentes tecnologías. En este sentido, el biorreactor de membrana (MBR) es uno de los procesos que han cobrado mayor importancia en el tratamiento de lixiviados. Este proceso se ha aplicado con éxito para tratar las aguas residuales con compuestos tóxicos en concentraciones bajas [39,40]. Además de la calidad del agua tratada lograda, otra ventaja de los MBR en comparación con otras tecnologías es la elevada concentración de biomasa que se puede mantener en el reactor.

En la Tabla 1.4 se recogen los resultados de la búsqueda bibliográfica realizada en torno a plantas de tratamiento de lixiviados con tecnología MBR y las características de las mismas. Se ha incluido el tamaño del MBR (en términos de superficie de membrana), la configuración de la membrana, las características del lixiviado y las características de licor de mezcla encontradas en bibliografía.

Cabe destacar que la mayoría de estudios encontrados sobre el tratamiento de lixiviados se ha realizado a escala de laboratorio o piloto, centrándose la mayoría de los trabajos principalmente en la calidad del agua depurada [41,42].

Álvarez-Vazquez et al., (2004) realizaron una comparación entre la calidad del lixiviado tratado con tecnología MBR y con otras técnicas

biológicas [43]. Llegaron a la conclusión de que el MBR ofrece una alta eficacia en la eliminación de DQO para los afluentes menos biodegradables. Campagna et al., (2013) evaluaron el tamaño de las fracciones de la materia orgánica de un lixiviado de vertedero y la evolución de estas después de un tratamiento con MBR y después de una etapa de nanofiltración adicional. Los resultados indicaron que un tercio de la materia orgánica está en forma particulada o coloidal y aproximadamente la mitad de la fracción orgánica tiene un peso molecular inferior a 500 Da [44].

El principal problema para la aplicación de un MBR al tratamiento de lixiviados es el ensuciamiento de las membranas, debido a la composición del mismo y que podría hacer inviable el proceso, teniéndose que aumentar la presión transmembranal (PTM) excesivamente para lograr una densidad de flujo de permeado adecuada.

Como se ha comentado anteriormente, las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), son los principales responsables del ensuciamiento de la membrana [13]. Sin embargo, a diferencia de las aplicaciones de MBR a las aguas residuales urbanas, sólo se encuentran algunos artículos sobre la caracterización de licor de mezcla de plantas industriales. Sólo Sanguanpak et al. (2015) mostraron los resultados sobre la influencia del pH del lixiviado sobre la generación de EPS y consecuentemente en el ensuciamiento de la membrana [45].

A continuación, en la Tabla I.4 se muestran los parámetros encontrados en bibliografía acerca de tratamiento de lixiviados con tecnología MBR.

Introducción

Tabla 1.4: Información bibliográfica sobre MBR que tratan lixiviado

Autor	Escala (Superficie membrana)	Configuración MBR	Características lixiviados	Características físico-químicas del licor de mezcla
Boonyaroj et al. (2012) [39]	Planta piloto	No descrito	pH = 7.4, DQO = 9306 mg/L, N-NH ₃ = 138 mg/L, SS = 1240 mg/L, conductividad = 23.5 mS/cm	SSLM = 10000–12000 mg/L, índice volumétrico de fangos = 30–60 mL/g
Campagna et al. (2013) [44]	Escala real, tratando 2000 m ³ /d	Externo (tubular)	DQO = 16360 mg/L, N-NH ₄ ⁺ = 2532 mg/L, conductividad = 33.9 mS/cm	Resultados no mostrados
Canziani et al. (2006) [46]	Piloto (0.24 m ²)	Externo (membranas cerámicas)	DQO = 6316 mg/L, N-NH ₄ ⁺ = 1497 mg/L	SSLM = 5000–8000 mg/L, Y = 0.67 gSS/gDQO
Hasar et al. (2009) [47]	Laboratorio (0.0390 m ²)	Sumergidas (fibra hueca)	pH = 6.45–6.50, DQOs = 8500–14200 mg/L, N-NH ₄ ⁺ = 1100– 2150 mg/L. Mezcla con agua residual urbana	SSLM = 4000-10000 mg/L
Hashisho et al. (2016) [48]	Laboratorio	Sumergidas (comparación entre fibra hueca y planas)	pH = 8.43, DQO = 5978 mg/L, N-NH ₄ ⁺ = mg/L = 2464 , NT = 2543 mg/L	Resultados no mostrados
Litas et al. (2012) [49]	Planta piloto	Sumergidas (planas)	pH = 8.7, DQO = 2544 mg/L, N-NH ₄ ⁺ = mg/L = 269 , NT = 388 mg/L. Diluido 1:1 con agua residual	SSLM aumentando entre 2000 y 25000 mg/L, % SSV = 84 – 70,

Autor	Escala (Superficie membrana)	Configuración MBR	Características lixiviados	Características físico-químicas del licor de mezcla
			urbana	
Rizkallah et al. (2013) [50]	Planta piloto (0.929 m ²)	Sumergidas (fibra hueca)	pH = 7.26 – 7.91, DQO = 9000-20000 mg/L, N-NH ₃ = 1800-4000 mg/L; NT = 2000-6000 mg/L, SS = 625-938 mg/L, VSS = 300–500 mg/L, conductividad = 38.2–50.4 mS/cm	Hasta 7000 mg/L de SSVLM
Sanguanpak et al. (2015) [51]	Laboratorio (0.07 m ²)	Sumergidas (fibra hueca)	DQO = 5445 mg/L	Potencial Zeta entre -13 y -21 mV, SMP _p = 98.8–132.2 mg/L, SMP _c = 24.3–44.6 mg/L, eEPS _p = 50.4–68.3 mg/gSS, eEPS _c = 18.4–29.4 mg/gSS, SS = 18-80 mg/L, tamaño medio partículas = 54-58 micras
Svojitka et al. (2009) [40]	Laboratorio (0.1 m ²)	Externas (tubulares)	pH= 8.5, DQO= 2200 mg/L, N-NH ₄ ⁺ = 1200 mg/L; NT= 1258 mg/L	SSLM = 7100 – 11800 mg/L

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ley de Aguas, Real Decreto Legislativo 1/2001, BOE-A-2001-14276. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y medio Ambiente, 2001.
- [2] Directiva 91/271/CEE sobre Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas., (1991).
- [3] D. Jenkins, J. Wanner, Activated sludge - 100 years and counting, IWA Publishing, 2014.
- [4] S.R. Hoover, N. Porges, Assimilation of dairy wastes by activated sludge II - The equation of synthesis and rate of oxygen utilization, Sew. Ind. Wastes. 24 (1952) 306–312.
- [5] M. Cheryan, Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, Technomic Publishing Company, Lancaster, 1998.
- [6] E. Alventosa, Ultrafiltración de efluentes de la industria textil. Estudio de los parámetros de operación y mecanismos de ensuciamiento, Universitat Politècnica de València, 2015.
- [7] M. Mulder, Basic principles of membrane technology, Kluwer Academic, Holanda, 2000.
- [8] M. Luján-Facundo, Influencia de la aplicación de ultrasonidos en la limpieza de membranas de ultrafiltración empleadas en separación de proteínas en la industria láctea, Universitat Politècnica de València, 2016.
- [9] K. Nouha, R.S. Kumar, S. Balasubramanian, R.D. Tyagi, Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation, J. Environ. Sci. (China). (2016) 1–21.
- [10] Z. Ding, I. Bourven, G. Guibaud, E.D. van Hullebusch, A. Panico, F. Pirozzi, et al., Role of extracellular polymeric substances (EPS) production in bioaggregation: application to wastewater treatment, Appl. Microbiol. Biotechnol. 99 (2015) 9883–9905.
- [11] J. Huang, Y. Shi, G. Zeng, Y. Gu, G. Chen, L. Shi, et al., Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: An overview, Chemosphere. 157 (2016) 137–151.

- [12] H. Yu, G. Xu, F. Qu, G. Li, H. Liang, Effect of solid retention time on membrane fouling in membrane bioreactor: from the perspective of quorum sensing and quorum quenching, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 7887–7897.
- [13] S. Judd, *The MBR Book. Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment*, 2nd Editio, Elsevier, 2011.
- [14] CEDEX, *Guía técnica para la implantación de biorreactores de membrana*, Ministerio de Fomento, 2014.
- [15] F. Meng, S. Zhang, Y. Oh, Z. Zhou, H.S. Shin, S.R. Chae, Fouling in membrane bioreactors: An updated review, *Water Res.* 114 (2017) 151–180.
- [16] C.V. Smith, D.O. Gregorio, R.M. Talcott, The use of ultrafiltration membranes for activated sludge separation, *Proc. 24th Ind. Waste Conf. Purdue Univ. USA.* (1969) 1300–1310.
- [17] F.W. Hardt, L.S. Clesceri, N.L. Nemerow, D.R. Washington, Solids separation by ultrafiltration for concentrated activated sludge, *J. Water Pollut. Control Fed.* 42 (1970) 2135–2148.
- [18] I. Bemberis, P.J. Hubbard, L. F.B., Membrane sewage treatment systems potential for complete wastewater treatment, *Am. Soc. Agric. Eng. Winter Meet.* 878 (1971) 1–28.
- [19] K. Yamamoto, M. Hiasa, T. Mahmood, T. Matsuo, Direct solid-liquid separation using hollow fibre membrane in an activated sludge aerobic tank, *Water Sci. Technol.* 21 (1989) 43–54.
- [20] S. Judd, www.thembrsite.com, (n.d.).
- [21] T. Stephenson, S.J. Judd, B. Jefferson, K. Brindle, *Membrane bioreactors in wastewater treatment*, IWA Publishing, London, 2000.
- [22] N. Cicek, J.P. Franco, M.T. Suidan, U. V., Using a membrane bioreactor to reclaim water, *J. Am. Water Work. Assoc.* 90 (1998) 105–113.
- [23] A. Santos, W. Ma, S.J. Judd, Membrane bioreactors: Two decades of research and implementation, *Desalination.* 273 (2011) 148–154.
- [24] Y. Liu, Z. Liu, A. Zhang, Y. Chen, X. Wang, The role of EPS concentration on membrane fouling control: Comparison analysis of hybrid membrane

Introducción

- bioreactor and conventional membrane bioreactor, *Desalination*. 305 (2012) 38–43.
- [25] Z. Wang, Z. Wu, S. Tang, Extracellular polymeric substances (EPS) properties and their effects on membrane fouling in a submerged membrane bioreactor., *Water Res.* 43 (2009) 2504–2512.
- [26] E. Zuriaga-Agustí, A. Bes-Piá, J.A. Mendoza-Roca, J.L. Alonso-Molina, Influence of extraction methods on proteins and carbohydrates analysis from MBR activated sludge flocs in view of improving EPS determination, *Sep. Purif. Technol.* 112 (2013) 1–10.
- [27] M. Ras, E. Girbal-Neuhauser, E. Paul, M. Spérandio, D. Lefebvre, Protein extraction from activated sludge: an analytical approach., *Water Res.* 42 (2008) 1867–78.
- [28] H. Lin, M. Zhang, F. Wang, F. Meng, B.-Q. Liao, H. Hong, et al., A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies, *J. Memb. Sci.* 460 (2014) 110–125.
- [29] F. Meng, S.R. Chae, A. Drews, M. Kraume, H.S. Shin, F. Yang, Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material, *Water Res.* 43 (2009) 1489–1512.
- [30] S. Rosenberger, C. Laabs, B. Lesjean, R. Gnirss, G. Amy, M. Jekel, et al., Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment, *Water Res.* 40 (2006) 710–720.
- [31] C. Jarusutthirak, G. Amy, Role of soluble microbial products (SMP) in membrane fouling and flux decline, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 969–974.
- [32] A. Drews, M. Vocks, U. Bracklow, V. Iversen, M. Kraume, Does fouling in MBRs depend on SMP?, *Desalination*. 231 (2008) 141–149.
- [33] U. Metzger, P. Le-Clech, R.M. Stuetz, F.H. Frimmel, V. Chen, Characterisation of polymeric fouling in membrane bioreactors and the effect of different filtration modes, *J. Memb. Sci.* 301 (2007) 180–189.
- [34] Z. Ahmed, J. Cho, B.-R. Lim, K.-G. Song, K.-H. Ahn, Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 287 (2007) 211–218.

- [35] A. Massé, M. Spérandio, C. Cabassud, Comparison of sludge characteristics and performance of a submerged membrane bioreactor and an activated sludge process at high solids retention time, *Water Res.* 40 (2006) 2405–2415.
- [36] L. Ji, J. Zhou, Influence of aeration on microbial polymers and membrane fouling in submerged membrane bioreactors, *J. Memb. Sci.* 276 (2006) 168–177.
- [37] J.R. Pan, Y.C. Su, C. Huang, H.C. Lee, Effect of sludge characteristics on membrane fouling in membrane bioreactors, *J. Memb. Sci.* 349 (2010) 287–294.
- [38] E. Zuriaga-Agustí, J.A. Mendoza-Roca, A. Bes-Piá, J.L. Alonso-Molina, F. Muñagorri-Mañueco, G. Ortiz-Villalobos, et al., Comparison between mixed liquors of two side-stream membrane bioreactors treating wastewaters from waste management plants with high and low solids anaerobic digestion, *Water Res.* 100 (2016) 517–525.
- [39] V. Boonyaraj, C. Chiemchaisri, W. Chiemchaisri, S. Theepharaksapan, K. Yamamoto, Toxic organic micro-pollutants removal mechanisms in long-term operated membrane bioreactor treating municipal solid waste leachate., *Bioresour. Technol.* 113 (2012) 174–80.
- [40] J. Svojitka, T. Wintgens, T. Melin, Treatment of landfill leachate in a bench scale MBR, *Desalin. Water Treat.* 9 (2009) 136–141.
- [41] F.N. Ahmed, C.Q. Lan, Treatment of landfill leachate using membrane bioreactors: A review, *Desalination.* 287 (2012) 41–54.
- [42] H. Lin, W. Gao, F. Meng, B.-Q. Liao, K.-T. Leung, L. Zhao, et al., Membrane Bioreactors for Industrial Wastewater Treatment: A Critical Review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42 (2012) 677–740.
- [43] H. Alvarez-Vazquez, B. Jefferson, S.J. Judd, Membrane bioreactors vs conventional biological treatment of landfill leachate: a brief review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79 (2004) 1043–1049.
- [44] M. Campagna, M. Cakmakci, F.B. Yaman, B. Ozkaya, Molecular weight distribution of a full-scale landfill leachate treatment by membrane bioreactor and nanofiltration membrane., *Waste Manag.* 33 (2013) 866–70.
- [45] S. Sanguanpak, C. Chiemchaisri, W. Chiemchaisri, K. Yamamoto, Influence of operating pH on biodegradation performance and fouling propensity in

Introducción

- membrane bioreactors for landfill leachate treatment, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 102 (2015) 64–72.
- [46] R. Canziani, V. Emondi, M. Garavaglia, F. Malpei, E. Pasinetti, G. Buttiglieri, Effect of oxygen concentration on biological nitrification and microbial kinetics in a cross-flow membrane bioreactor (MBR) and moving-bed biofilm reactor (MBBR) treating old landfill leachate, *J. Memb. Sci.* 286 (2006) 202–212.
- [47] H. Hasar, U. Ipek, C. Kinaci, Joint treatment of landfill leachate with municipal wastewater by submerged membrane bioreactor, *Water Sci. Technol.* 60 (2009) 3121–3127.
- [48] J. Hashisho, M. El-Fadel, M. Al-Hindi, D. Salam, I. Alameddine, Hollow fiber vs. flat sheet MBR for the treatment of high strength stabilized landfill leachate, *Waste Manag.* (2016).
- [49] G.C. Litas, A.I. Zouboulis, D. Zaboulis, P. Samaras, The use of a submerged membrane batch reactor (SMBR) for co-treatment of landfill leachates and domestic wastewater, *Desalin. Water Treat.* 39 (2012) 284–290.
- [50] M. Rizkallah, M. El-Fadel, P.E. Saikaly, G.M. Ayoub, N. Darwiche, J. Hashisho, Hollow-fiber membrane bioreactor for the treatment of high-strength landfill leachate, *Waste Manag. Res.* 31 (2013) 1041–1051.
- [51] S. Sanguanpak, C. Chiemchaisri, W. Chiemchaisri, K. Yamamoto, Influence of operating pH on biodegradation performance and fouling propensity in membrane bioreactors for landfill leachate treatment, *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 102 (2015) 64–72.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

El principal objetivo de la tesis doctoral es el estudio de las características físicas y químicas del licor de mezcla en Biorreactores de Membrana (MBR) y su correlación con los parámetros de operación de la instalación.

Para conseguir este objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización física del licor de mezcla procedente de un MBR que trata aguas residuales urbanas y dos MBR que tratan los lixiviados procedentes de dos plantas de tratamiento de residuos orgánicos municipales.

2. Caracterización química del licor de mezcla procedente de los MBR anteriormente comentados, a través de la determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos tanto de los productos solubles microbianos (SMP) como de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS).

3. Comparación de las concentraciones de proteínas y carbohidratos contenidas en los SMP y las eEPS de los MBR estudiados.

4. Comparación de diferentes métodos de extracción de las eEPS, basados en el uso de una resina de intercambio catiónico (CER) y de un tensioactivo (Triton X-100).

5. Análisis de las correlaciones estadísticas entre los parámetros físicos y químicos de caracterización del licor de mezcla y entre estos y los principales parámetros de operación de los MBR (tiempo de retención hidráulico y carga másica).

6. Caracterización de las eEPS mediante métodos de microscopía de epifluorescencia. Comparación de métodos de tinción.

Objetivos

7. Determinación de las características principales de las proteínas contenidas en las eEPS mediante comparación con proteínas puras, a través del análisis de su punto isoeléctrico y de su caracterización con cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución. Extracción y purificación de las proteínas de las eEPS.

8. Estudio del ensuciamiento de membranas de ultrafiltración, en planta de laboratorio, mediante ensayos con proteínas purificadas a partir de las eEPS extraídas y de su mezcla con alginato sódico.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se recogen los materiales y métodos empleados para la caracterización del licor de mezcla procedente de diferentes estaciones depuradoras de aguas residuales seleccionadas (una urbana y dos industriales). Cabe comentar que la caracterización de las muestras de licor de mezcla incluye una caracterización física, química y óptica. Adicionalmente y, para completar la caracterización, se ha realizado puntualmente otro tipo de análisis sobre el fango como es el análisis de la respirometría. En el caso de las estaciones depuradoras de aguas residuales industriales se ha incluido también la caracterización de los afluentes.

1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE LICOR DE MEZCLA

1.1 EDAR URBANA

La EDAR de Masía del Conde, está ubicada en la población de Loriguilla ubicada a 20 km de Valencia (Figura III.1). Su sistema de depuración cuenta con un pretratamiento mediante desbaste, desarenado y desengrasado. El tratamiento secundario se basa en un proceso de fangos activos en reactor biológico con aireación prolongada y eliminación de nitrógeno en tanque anóxico, seguido de un tratamiento mediante membranas de microfiltración (MBR). Como etapa final, se aplica un tratamiento de desinfección con lámparas ultravioletas. El agua tratada se reutiliza para riego de parques y jardines del propio municipio. Los fangos generados se llevan a un espesador para su concentración y, posteriormente, son deshidratados con una centrifuga.



Figura III.1: EDAR Loriguilla

En la Figura III.2 se muestra el esquema del proceso de depuración llevado a cabo en la EDAR de Loriguilla.

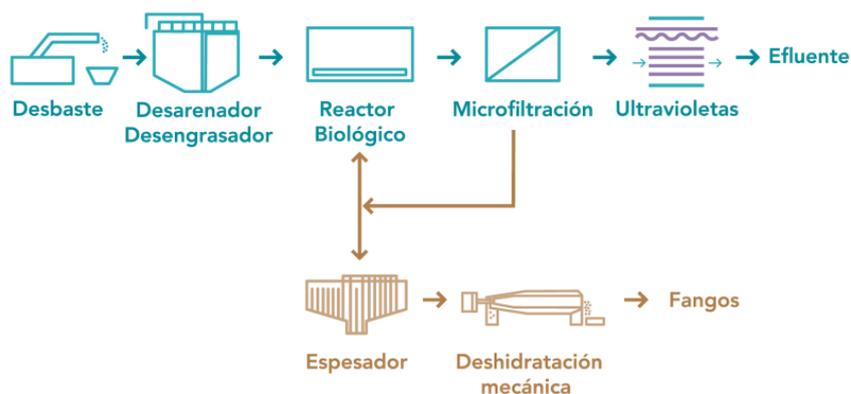


Figura III.2: Esquema del proceso de depuración de la EDAR de Loriguilla

Esta EDAR fue diseñada para tratar un caudal de $1000 \text{ m}^3/\text{d}$ pero actualmente trata una media de $353 \text{ m}^3/\text{d}$, sirviendo a una población de 1.413 habitantes equivalentes (He).

El biorreactor de membranas instalado cuenta con membranas planas de microfiltración de la marca KUBOTA, cuyas características se describen en la Tabla III.1. En total el MBR cuenta con 2 módulos tipo ES200 con un área efectiva de membrana total de 320 m^2 .

Tabla III.1: Características de las membranas

Parámetro	Valor
Material de la membrana	Polietileno clorado
Tamaño de poro	0.2 - 0.4 μm
Rango de pH	5 - 10
Rango de temperatura	5 – 40°C
Presión de filtración	≤ 20 kPa
Presión de limpieza	≤ 10 kPa
Concentración en Cl de NaClO	$\leq 1\%$

En el Anexo II se muestran los parámetros de operación de la EDAR en el periodo estudiado. A lo largo de este estudio se tomaron 40 muestras de licor de mezcla del MBR, tomadas con una periodicidad quincenal. Las muestras de licor de mezcla se mantuvieron refrigeradas a 4°C desde su recogida hasta su análisis, que fue realizado el mismo día de su recogida.

1.2 EDAR INDUSTRIALES

Para el análisis de muestras del licor de mezcla procedentes de depuradoras que tratan efluentes industriales, se seleccionaron dos depuradoras que tratan los efluentes generados en dos plantas de tratamiento de la Fracción Orgánica de Residuos Sólidos Urbanos (FORSU). Ambas plantas son gestionadas por la empresa URBASER. Específicamente, los efluentes proceden de los procesos de digestión anaerobia y compostaje. Estos efluentes, conocidos como lixiviados, deben ser tratados debido a su alta carga contaminante, por lo que ambas plantas cuentan con un proceso MBR en su proceso de depuración.

La diferencia entre ambas plantas es que el proceso digestión anaerobia en una planta se lleva a cabo mediante un sistema de alto contenido en sólidos (proceso en vía seca, es decir, con una concentración de sólidos superior al 15% [1]) y en la otra planta por medio de un sistema

Material y Métodos

de bajo contenido de sólidos (proceso en vía húmeda, es decir, con una concentración de sólidos inferior al 10%). Los procesos MBR que tratan estos efluentes se referenciarán como MBR-HS y MBR-LS, respectivamente.

Para ambas plantas de tratamiento la configuración MBR es la misma, es decir, las membranas son externas y el licor de mezcla es bombeado desde el reactor biológico al módulo de membranas de ultrafiltración. Las membranas son tubulares multicanal y la superficie activa instalada es de 127 m² y 72 m² en MBR-LS y MBR-HS, respectivamente. El reactor biológico consiste en un tanque anóxico, dos tanques aerobios y un tanque final que puede ser operado aeróbicamente o anóxicamente, dependiendo de las eficiencias de eliminación del nitrógeno. Por lo tanto, ambas plantas fueron diseñadas para eliminar la materia orgánica y el nitrógeno. Actualmente ambas plantas están gestionadas por la empresa URBASER.

Dado que ambos MBR tienen una configuración externa al reactor biológico, las muestras de licor de mezcla fueron tomadas en el punto de entrada al MBR.

En este estudio se presentan un total de 6 muestras de cada uno de los MBR, tomadas con una periodicidad mensual. Las muestras de licor de mezcla se mantuvieron a 4°C desde su recogida hasta su análisis. No se incluyen los parámetros de operación de las plantas por temas de confidencialidad.

2. ESQUEMA DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

En la presente tesis doctoral, los ensayos se dividieron en diferentes fases. Sin embargo, cabe comentar que se partió de unos resultados previos obtenidos en el Trabajo Final de Máster de la autora. En éste se determinó el modo de conservación de la muestra desde su recogida en la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) hasta el laboratorio. Además, se probaron y seleccionaron diferentes protocolos de extracción de EPS.

Finalmente, se seleccionaron los métodos de análisis de proteínas y carbohidratos que han sido utilizados en esta tesis.

Una vez conocido el punto de partida, se establecieron tres fases: en la primera fase se tomaron 20 muestras de licor de mezcla del MBR de la EDAR de Loriguilla, a los cuales se les analizaron los parámetros mostrados en la Figura III.3.

En la segunda fase, se caracterizó otra serie de 20 muestras, procedentes de la misma EDAR urbana, donde se midieron los parámetros mostrados en la Figura III.4.

Finalmente, en la tercera fase, se caracterizaron 12 muestras de licor de mezcla procedentes de las dos EDAR industriales (6 muestras de cada una), donde se analizaron los parámetros mostrados en la Figura III.5. Adicionalmente, se caracterizaron los afluentes de las EDAR industriales.

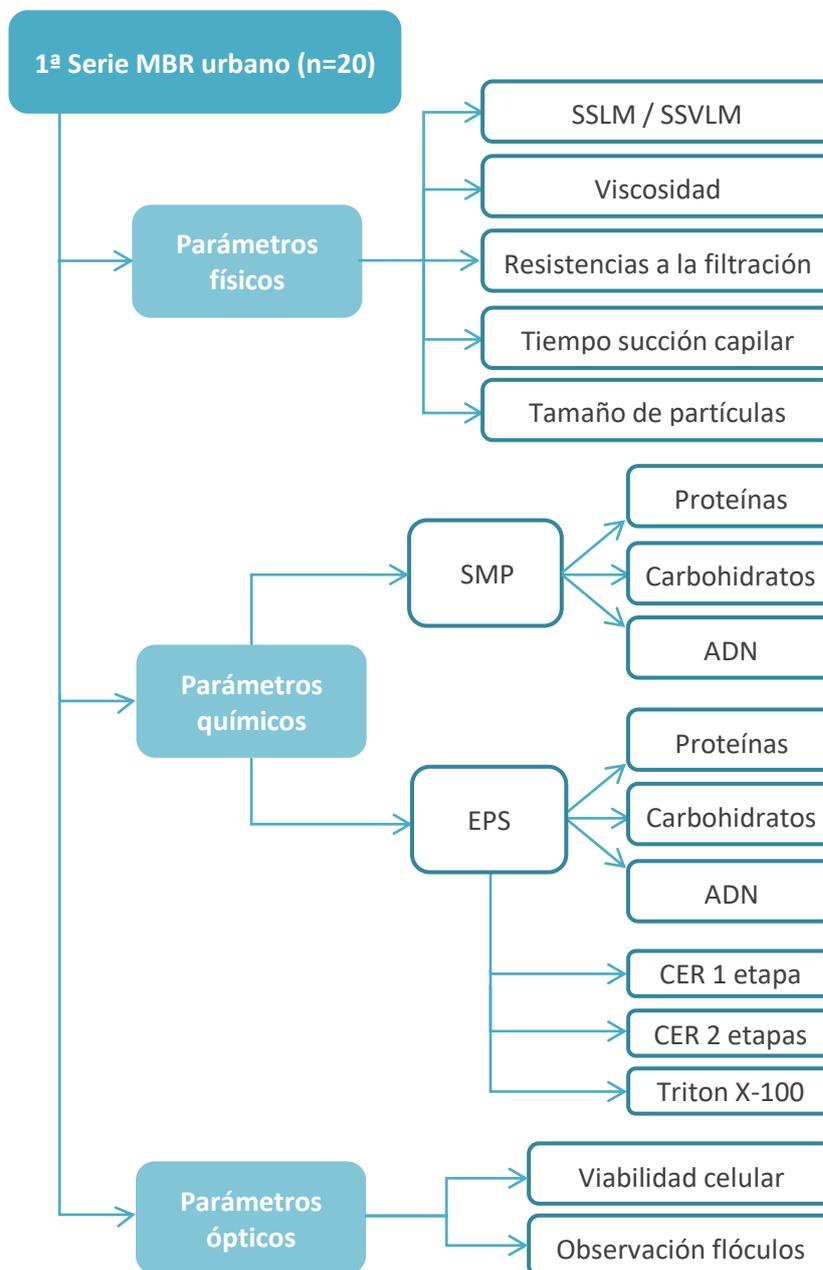


Figura III.3: Análisis para las muestras de licor de mezcla del MBR urbano (SERIE 1)

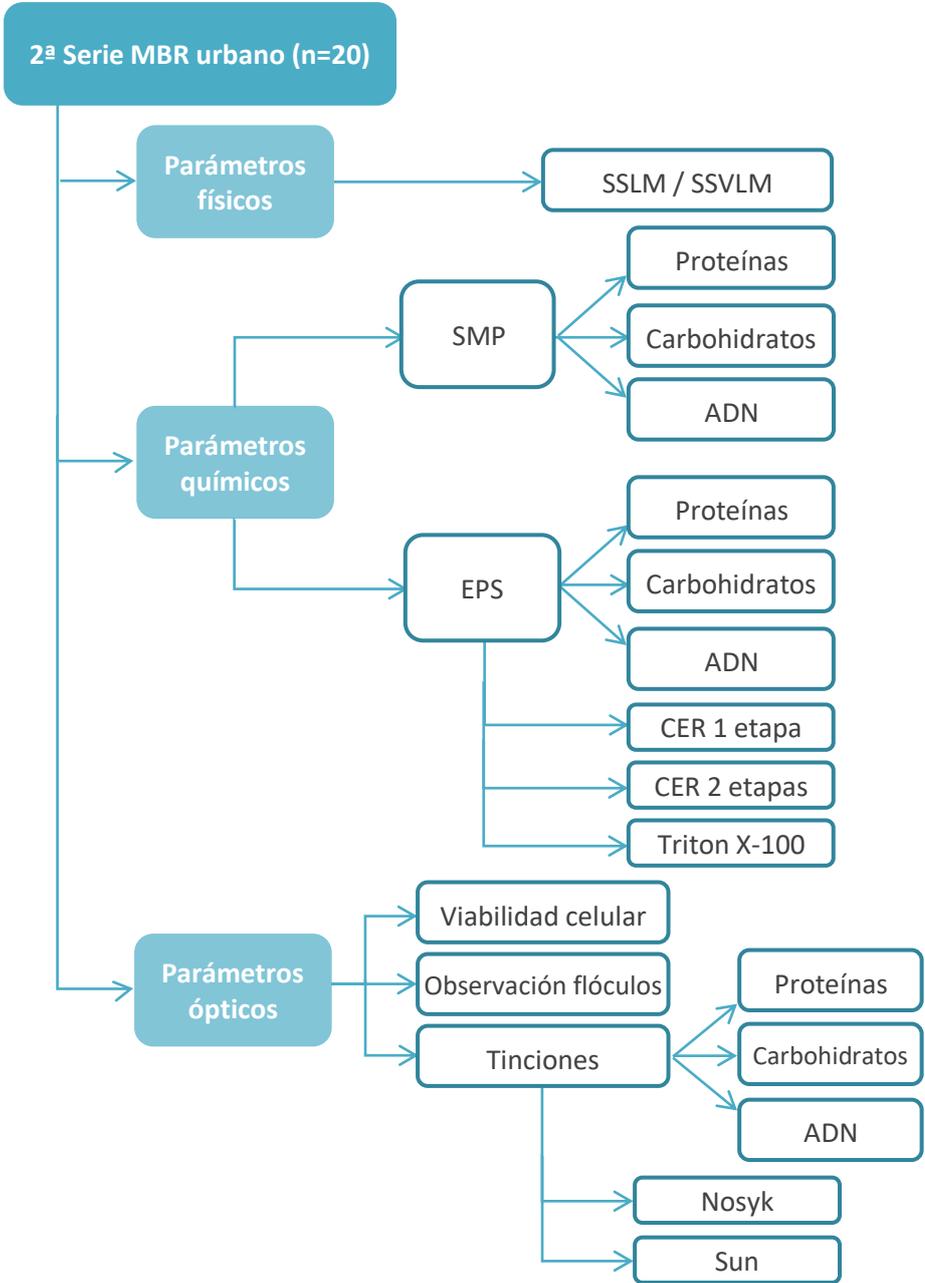


Figura III.4: Análisis para las muestras de licor de mezcla del MBR urbano (SERIE 2)

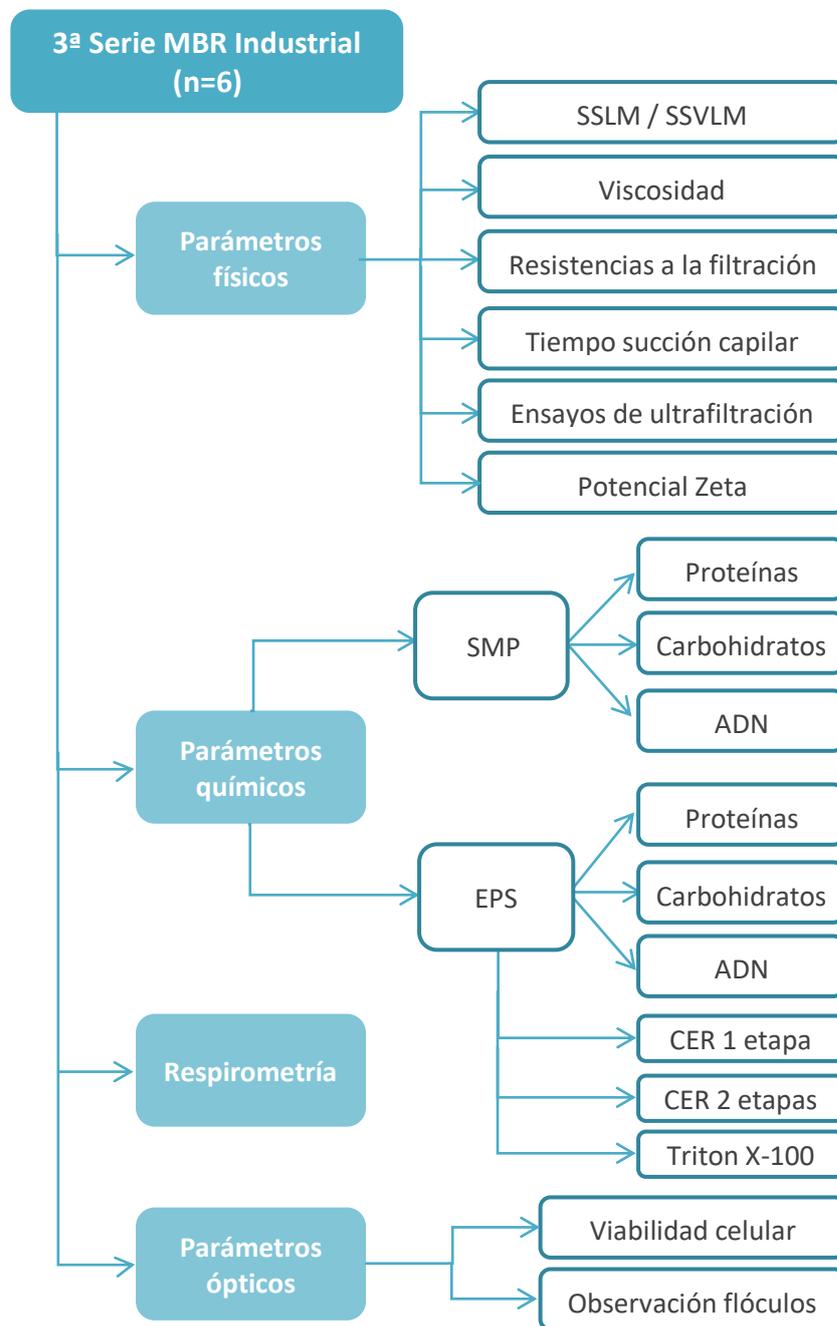


Figura III.5: Análisis para las muestras de licor de mezcla del MBR industrial (SERIE 3)

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL LICOR DE MEZCLA

3.1. SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN EN EL LICOR DE MEZCLA

3.1.1. Sólidos en suspensión totales en el licor de mezcla (SSLM)

La medida de concentración de los sólidos en suspensión en el licor de mezcla indica tanto la cantidad de biomasa presente en el reactor biológico como la materia mineral en un determinado volumen de licor de mezcla, es decir, el conjunto de materia orgánica e inorgánica. Este parámetro mide la cantidad de sólidos que son no filtrables, es decir, aquellos con un tamaño superior $0.45\ \mu\text{m}$ y, que por tanto, no pasan a través de un filtro de dicho diámetro de poro. Su valor vendrá expresado en mg/L y su procedimiento de determinación se encuentra descrito en las normas UNE-EN 77030 y UNE-EN 77034.

Modo de operación:

1. Se introduce el filtro en una estufa a una temperatura de 105°C durante una hora.
2. A continuación, tras dejar enfriar el filtro hasta temperatura ambiente en el desecador, se pesa en la balanza previamente calibrada (P_0).
3. Se acopla el filtro en el equipo de filtración y se hacen pasar a través de él 50 ml de muestra homogeneizada.
4. Una vez filtrado, se vuelve a introducir el filtro en la estufa durante una hora a 105°C .
5. Finalmente, se coloca en el desecador para que no absorba humedad durante media hora y se pesa de nuevo (P_1).

Material y Métodos

El contenido de sólidos en suspensión de la muestra se determina por diferencia de pesada del filtro antes y después de la filtración, dividiéndolo por el volumen de muestra tal y como se indica en la (Ec. III.1).

$$SSLM = \frac{P_1 - P_0}{V} \quad (\text{Ec. III.1})$$

Donde,

- P₀ peso del filtro expresado en mg
- P₁ peso del filtro más el residuo seco expresado en mg
- V volumen de muestra expresado en L

Los equipos y material empleados para la determinación de los SSLM se detallan a continuación:

- Estufa marca SELECTA, con rango de temperaturas 0-250 °C.
- Filtros de vidrio borosilicatado ($\Phi_{\text{filtro}}=47 \text{ mm}$, $\Phi_{\text{poro}}=0.45 \mu\text{m}$).
- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo, modelo AE-240.
- Embudos de filtración de acero inoxidable.
- Bomba de vacío modelo Rocker 300 de Rocker Scientific Co., Ltd.
- Matraz kitasato.
- Desecador.
- Agitador magnético modelo A-163 de SBS (España).
- Pipeta de 50 mL y propipeta.

3.1.2. Sólidos en suspensión volátiles en el licor de mezcla (SSVLM)

Los sólidos en suspensión volátiles en el licor de mezcla son indicadores de la materia orgánica presente en el reactor biológico. Se caracterizan, a diferencia de los sólidos inorgánicos, por volatilizarse cuando se someten a temperaturas de 550 °C en la mufla.

Modo de operación:

1. Se pesa un crisol junto con el filtro conteniendo los SSLM (P_2).
2. Se introduce en la mufla a una temperatura de 550 °C durante una hora, donde se calcinará la fracción volátil de la muestra.
3. A continuación, se introduce el crisol, junto con el filtro, en el desecador para que no absorba humedad hasta que esté a temperatura ambiente.
4. Se pesa de nuevo el crisol con el filtro (P_3).

La diferencia de pesada entre el crisol con el filtro antes y después de entrar en la mufla dividida por el volumen de muestra de licor de mezcla (filtrado en el apartado 3.1.1.), nos da el valor de los sólidos en suspensión volátiles, tal y como se indica en la (Ec. III.2).

$$SSVLM = \frac{P_3 - P_2}{V} \quad (Ec. III.2)$$

Donde,

- P_2 peso del crisol más filtro expresado en mg
- P_3 peso del crisol y filtro al salir de la mufla, expresado en mg
- V volumen de muestra en L

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

- Mufla NABERTHERM B180, con un rango de temperaturas de 0 a 1100°C.
- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo, modelo AE-240.
- Crisoles.

3.2. REOLOGÍA DEL FANGO ACTIVO

Un fluido es un medio continuo fácilmente deformable, cualquier esfuerzo cortante (τ) que se le aplique provocará una deformación en forma de gradiente de velocidades ($\dot{\gamma}$), es decir, provocará el movimiento del fluido. El coeficiente de proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y el gradiente de velocidades es lo que se conoce como **viscosidad** (Ec. III.3), es decir, la viscosidad (μ) es una medida cuantitativa de la resistencia de un fluido al movimiento [2].

$$\mu = \frac{\tau}{\frac{du}{dy}} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (\text{Ec. III.3})$$

La viscosidad varía con la presión y con la temperatura. La variación de la viscosidad con la presión no es significativa y suele despreciarse en la mayoría de casos. Sin embargo, la variación con la temperatura es muy importante y debe tenerse en cuenta, por lo que las medidas de viscosidad siempre se realizan a temperatura constante.

Dependiendo del comportamiento del fluido, respecto a la variación del esfuerzo cortante frente al gradiente de velocidades, este se puede clasificar en dos grandes grupos, Newtonianos y no-Newtonianos. En la Figura III.6 se muestra el comportamiento de los mismos.

En un **fluido Newtoniano** la viscosidad permanece constante con el tiempo. El fluido se comporta según la ley lineal de la ecuación de Newton (Ec. III.3), es decir, existe proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y el gradiente de velocidad.

Para estudiar el comportamiento de un **fluido no-Newtoniano** (el cual no sigue la ley de la (Ec. III.3) se tiene que estudiar su reología, dado que la viscosidad depende del grado de deformación ($\dot{\gamma}$). En este caso, la viscosidad se denomina **viscosidad aparente** (η). A su vez, existen diferentes tipos de fluidos no-Newtonianos (Figura III.6):

1. **Dilatante:** Aquel fluido en el cual la viscosidad aumenta con la velocidad de deformación, es decir, la resistencia a la deformación aumenta al aumentar el esfuerzo cortante, con la velocidad.
2. **Pseudoplástico:** Aquel fluido en el que disminuye su viscosidad y su esfuerzo cortante, al aumentar la velocidad de deformación. Si el efecto anterior es muy marcado, el fluido se denomina **Plástico**.
3. **Plástico de Bingham:** Aquel fluido que requiere un esfuerzo finito antes de comenzar a fluir.

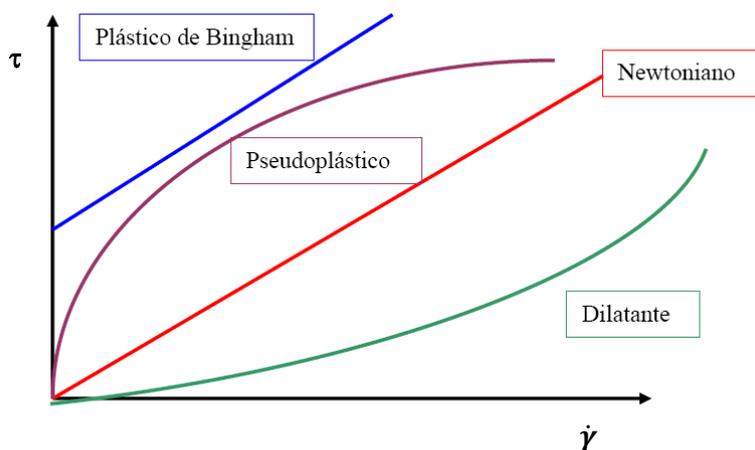


Figura III.6: Representación del esfuerzo cortante frente a la velocidad de corte para distintos fluidos.

Además, algunos fluidos no-Newtonianos, presentan un cambio de su viscosidad con el tiempo, lo que se conoce como tixotropía. Es decir, un fluido que requiere esfuerzos cortantes decrecientes para mantener constante la velocidad de deformación es un **fluido tixotrópico** (Figura III.7), es decir su viscosidad varía con el tiempo. En este tipo de fluidos se produce una disminución de la viscosidad al aplicar un esfuerzo y recupera su viscosidad inicial tras un tiempo en reposo.

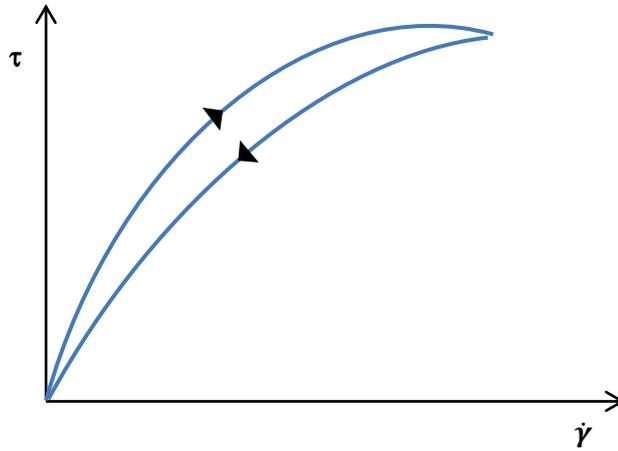


Figura III.7: Representación del comportamiento de un fluido tixotrópico.

El fango activo tiene un comportamiento no-Newtoniano, concretamente pseudoplástico, lo que implica que la relación entre la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) y el esfuerzo cortante no es proporcional [3,4].

Es importante comprobar si el fango activo estudiado se comporta como un fluido tixotrópico, dado que hay algunos fangos que sí se comportan de este modo [5,6].

La **reología** es la rama de la física que estudia el comportamiento de los fluidos. Este concepto fue propuesto por el científico Eugene Bingham en la primera mitad del siglo XX. La reología estudia el vínculo entre la fuerza que se ejerce sobre un material y la deformación que éste experimenta al fluir. Las propiedades que se encarga de estudiar la reología se analizan en un reómetro, que posibilita la realización de deformaciones bajo control. Se puede determinar la viscosidad y el esfuerzo cortante de cada sustancia, entre otras propiedades [7].

Para representar el comportamiento de un fluido se conocen diferentes **modelos reológicos**. Dependiendo de la naturaleza del fluido, estos predicen la viscosidad aparente con diferentes grados de

complejidad, es decir, en función del número de parámetros. La mayoría de ellos son modelos empíricos que describen la viscosidad aparente (o el esfuerzo) a partir de los resultados obtenidos experimentalmente con un reograma.

- **Modelo de Ostwald de Waele o Ley de la Potencia.** Es el más comúnmente utilizado en fangos activos.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. III.4})$$

Donde K y n son parámetros empíricos, K es el índice de consistencia (Pa·s) y n es el índice de comportamiento de flujo (adimensional). Debido a que n determina el modo en que se desarrolla el flujo, si $n < 1$ el fluido se denomina pseudoplástico, estos fluidos fluyen más fácilmente aumentando la velocidad de deformación. Por el contrario, si $n > 1$ la resistencia a fluir aumenta con un aumento de la velocidad de corte, y el fluido se denomina dilatante. La mayoría de los fluidos no-Newtonianos son pseudoplásticos.

- **Modelo de Bingham.**

$$\tau = \tau_0 + \eta_p \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Ec. III.5})$$

Siendo τ_0 el esfuerzo umbral (Pa) y η_p la viscosidad plástica. τ_0 representa la resistencia del fango a la deformación hasta que se aplica una tensión suficiente para sobrepasar el límite elástico y η_p representa la pendiente de la tensión de corte lineal frente a la velocidad de deformación, y corresponde a la viscosidad límite del fluido cuando la velocidad de deformación tiende a un valor infinito.

- **Modelo de Herschel y Bulkley.**

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. III.6})$$

Este modelo se describe con tres parámetros τ_0 , K y n , antes definidos.

- **Modelo de Casson.**

$$\tau = \sqrt[n]{\tau_0^n + (\dot{\gamma} \cdot \eta_p)^n} \quad (\text{Ec. III.7})$$

El modelo se describe con tres parámetros τ_0 , n y η_p , antes definidos.

El modelo de Ostwald y el de Bingham son los modelos reológicos más sencillos y comúnmente utilizados para medir el licor de mezcla. El modelo de Herschel y Bulkley es una modificación modelo de Bingham realizada para tener en cuenta el tramo de comportamiento no lineal del fluido. Este modelo se utiliza para fangos activos cuando la concentración de sólidos en suspensión en el licor de mezcla es elevada.

La medida de la viscosidad se explica mediante el **Flujo de Couette**, el cual describe el flujo laminar de un fluido viscoso en el espacio entre dos cilindros rotatorios (Figura III.8a).

Cuando la velocidad angular del cilindro interior aumenta por encima de un valor umbral el flujo de Couette se desestabiliza, formándose un flujo laminar tridimensional compuesto por filas de torbellinos toroidales que giran en direcciones alternas conocido como vórtice de Taylor (Figura III.8b).

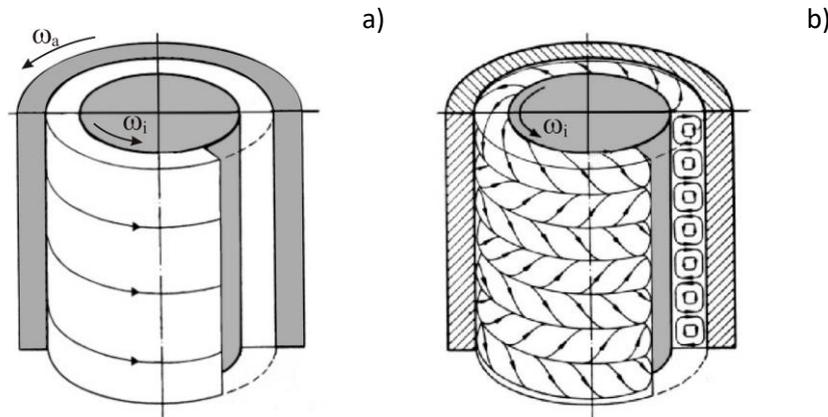


Figura III.8: Configuración de un sistema de Flujo de Couette-Taylor. Sin formación de vórtice de Taylor (a) y con vórtice de Taylor (b) [8]

El **número de Taylor** (Ta) es un número adimensional que caracteriza la importancia de las fuerzas centrífugas respecto a las fuerzas viscosas. Para el cálculo del mismo es necesario realizar experimentalmente un reograma. Se han encontrado numerosas ecuaciones para el cálculo del número de Taylor, tomándose la (Ec. III.8) como la ecuación válida para el fango activo [8].

$$Ta = \frac{\omega_i \cdot \sqrt{\frac{R_a + R_i}{2}} \cdot (R_a - R_i)^2 \cdot \rho \cdot R_i}{\eta \cdot R_a} \quad (Ec. III.8)$$

Siendo:

- ω velocidad angular
- R_a Radio del cilindro exterior
- R_i Radio del cilindro interior

Cuando el número de Taylor supera un valor crítico de 41.3, se produce inestabilidad inercial, dando lugar a la aparición de los vórtices de Taylor [8]. Cabe comentar que no es recomendable que aparezcan vórtices en el ensayo de reología, dado que las características del fango varían.

La velocidad angular se calcula mediante la (Ec. III.9) y teniendo en cuenta el factor M (Ec. III.10).

$$\omega = \frac{\dot{\gamma}}{M} \quad (\text{Ec. III.9})$$

$$M = \frac{1 + \delta^2}{\delta^2 - 1} \quad (\text{Ec. III.10})$$

Siendo δ

$$\delta = \frac{R_a}{R_t} \quad (\text{Ec. III.11})$$

3.2.1. Procedimiento experimental para el estudio de la reología

Para determinar la viscosidad del fango activo se ha utilizado el reómetro rotacional HAAKE RheoStress 1 de la marca Thermo Electron Corporation, el cual se muestra en la Figura III.9.

No existe un protocolo estandarizado para la caracterización reológica del fango activo [4,8] por lo que las condiciones del ensayo seleccionadas y la geometría utilizada se han seleccionado a partir de una búsqueda bibliográfica [2,9].

El ensayo para determinar la viscosidad aparente (η) se puede realizar variando la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) o el esfuerzo cortante (τ). En nuestro caso se trabajó variando la velocidad de deformación.

Dado que la temperatura tiene una gran influencia en la medida de la viscosidad, el equipo cuenta con control de la misma, para ello está equipado con un baño modelo HAAKE C25P Phoenix II. La temperatura se ha mantenido constante en 20°C.

Para el control del reómetro se ha utilizado el Software Rheowin Job Manager, versión 3.61.0004 y Rheowin Data Manager, versión 3.61.0004.



Figura III.9: Reómetro HAAKE RheoStress 1

Los pasos llevados a cabo por el equipo para realizar la medida son los siguientes:

1. En primer lugar hay que dejar 5 minutos de reposo al sistema para que se estabilice.
2. A continuación, se incrementa la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de 0 a 800 s^{-1} , constando de 80 pasos, siendo cada uno de 20 segundos.
3. Una vez alcanzada la $\dot{\gamma}$ de 800 s^{-1} , dejar 30 segundos de reposo.
4. Finalmente, descenso de la velocidad de deformación de 800 a 0 s^{-1} . Análogamente a la subida, se realizan 80 pasos de 20 segundos cada paso.

Material y Métodos

El ensayo se realizó con velocidad ascendente y descendente con el fin de evaluar el posible comportamiento tixotrópico del fango.

La geometría seleccionada fue **cilindro concéntrico**, dado que esta geometría es la más ampliamente utilizada en los estudios reológicos de fango activo. En la Figura III.10 se muestra el esquema de la geometría utilizado, corresponde a un sensor Z34DIN de acero inoxidable.

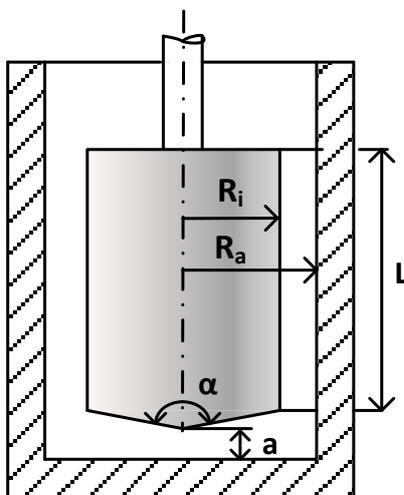


Figura III.10: Esquema de la geometría (cilindro concéntrico) del sensor utilizado, modelo Z34DIN

Siendo:

- R_a Radio del cilindro exterior, 18.44 mm
- R_i Radio del cilindro interior, 17 mm
- L Longitud del cilindro, 51 mm
- a Distancia, 7.2 mm
- α Ángulo 120°

3.3. TIEMPO DE SUCCIÓN CAPILAR

El tiempo de succión capilar (TSC) es una forma rápida y sencilla de evaluar la aptitud para la deshidratación de fangos mediante filtración, por lo que ha sido ampliamente usado para estudiar las propiedades coloidales de las suspensiones [11].

El fundamento del método se basa en que la deshidratación se alcanza mediante la succión aplicada al lodo por la acción capilar de un papel de filtro absorbente [12]. Una parte de la superficie del papel absorbente se expone al fango activo, mientras que el resto permanece libre para absorber el filtrado. La velocidad a la que el papel se humedece con el filtrado es una medida correlacionada con la aptitud para la deshidratación del fango. Se mide a través del tiempo empleado en recorrer la distancia entre dos circunferencias que detectan el avance del líquido sobre el papel.

La Figura III.11 muestra el equipo utilizado para la determinación del TSC, modelo 304M de la marca Triton Electronics.



Figura III.11: Equipo de medida del tiempo de succión capilar

El TSC se ha determinado siguiendo el método estándar 2710G [13].

Material y Métodos

Procedimiento de medida:

1. Colocar el papel de filtro absorbente entre el soporte del cabezal de ensayo y el bloque que contiene las probetas o sondas de acero inoxidable, de forma que las sondas toquen sobre la parte superior del papel de filtro.
2. Insertar el embudo apropiado en el cabezal de ensayo y asegurar contacto con el papel de filtro. Existen dos tipos de embudos: embudo de diámetro de apertura de 10 mm, para filtrado de fango lento, o embudo de 18 mm de diámetro de apertura, para filtrado rápido.
3. Poner el instrumento en "On". Se escuchará un corto sonido "beep".
4. Verter la muestra de fango dentro del embudo. El líquido de la muestra es absorbido por el papel de filtro, en una trayectoria circular de diámetro creciente. Cuando el frente del líquido alcanza el primer par de sensores (situados en la primera circunferencia), suena un "beep" característico y comienza el conteo del tiempo de succión capilar. Cuando el frente del líquido alcanza el siguiente sensor (situado en la segunda circunferencia), el conteo de tiempo se detiene. La luz de terminación comenzará a parpadear y se escuchará un segundo sonido "beep". Anotar la lectura del conteo (tiempo de succión capilar) en segundos y décimas de segundos.
5. Por último, se retira cuidadosamente la parte superior del cabezal de ensayo, y luego el embudo. Es importante limpiar cuidadosamente con un paño el cabezal de ensayo y el embudo. Cualquier humedad remanente en el cabezal de ensayo o en el embudo podría producir lecturas imprecisas.

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

La temperatura es un factor que afecta significativamente a las medidas. Su influencia puede corregirse por medio de la viscosidad a través de la (Ec. III.12).

$$TSC_1 = \frac{\mu_1}{\mu_2} \cdot TSC_2 \quad (\text{Ec. III.12})$$

Siendo μ_1 y μ_2 la viscosidad a la temperatura del ensayo y a la que se quiere ajustar el TSC.

3.4. POTENCIAL ZETA

El potencial zeta (PZ) es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar en la capa de iones que hay alrededor de la partícula, para desestabilizarla. Es una propiedad de las partículas que componen el fango activo.

La medida se ha realizado con el equipo ZETASIZER Nano ZS90 de Malvern Instruments (Figura III.12), utilizando una celda desechable con electrodos de oro tipo DTS 1060C.

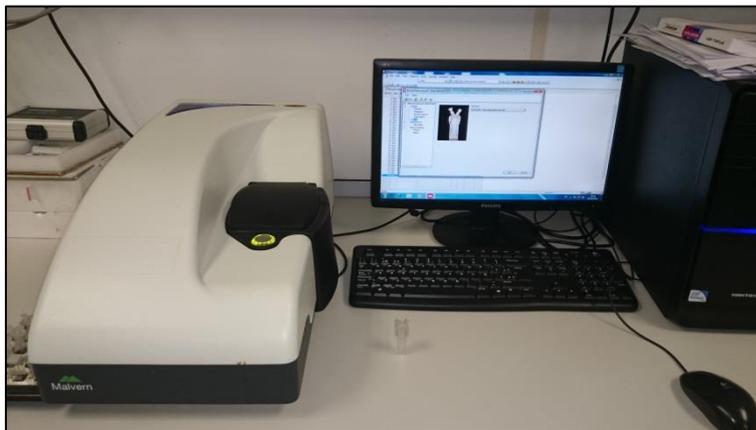


Figura III.12: Equipo de medición de Potencial Zeta, Zetasizer Nano ZS90

Material y Métodos

El equipo ofrece alta sensibilidad dado que combina las técnicas de "Velocimetría Láser Doppler" y "Análisis de Fase de la Difusión de Luz-PALS" en la técnica patentada por Malvern como "M3-PALS". El haz de difracción pasa a través de la célula y el haz de referencia se conduce por fuera de la célula. El haz de referencia se crea dividiendo el haz del láser y tiene la misma frecuencia y fase que éste. Las partículas de la célula de difracción pasan por el haz del láser y la luz difractada cambia de frecuencia según la velocidad de las partículas [14]. El esquema del funcionamiento del equipo se describe en la Figura III.13.

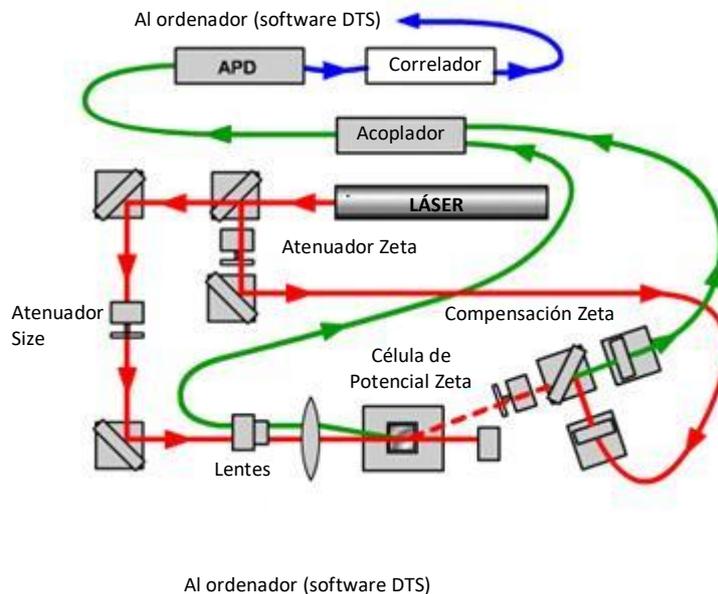


Figura III.13: Configuración óptica del Zetasizer Nano ZS (Fuente: Malvern)

El equipo cuenta con un software específico para procesar los resultados, se ha utilizado la versión V.7.03.

El potencial zeta ha sido determinado en las muestras de los productos solubles microbianos (SMP). También se han realizado medidas de potencial zeta en las muestras de EPS extraídas y purificadas con sulfato de amonio las cuales fueron diluidas 100 veces con agua desionizada, según recomienda la bibliografía [15].

3.4.1. Determinación del punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico (PI) es el valor de pH para el cual la muestra no presenta carga eléctrica, es decir, las cargas positivas se igualan a las cargas negativas (carga neta cero). A este valor de pH la solubilidad de la sustancia es prácticamente nula.

Es un concepto interesante en las proteínas, ya que estas tienen una carga neta dependiendo del pH del medio en el que se encuentren y de los aminoácidos que la componen. En el PI la proteína presenta su máxima posibilidad para ser precipitada al disminuir su solubilidad y facilitar su agregación.

Para la determinación del punto isoeléctrico se ha realizado un barrido de pH de la muestra, adicionando bien ácido clorhídrico 0.1 M o bien hidróxido sódico 0.1 M, y se ha medido el potencial zeta de la muestra hasta encontrar el punto en el que el PZ es 0.

Se ha determinado el punto isoeléctrico de las siguientes muestras:

- Productos solubles microbianos (SMP).
- Sustancias poliméricas extracelulares (EPS) extraídas y purificadas con sulfato de amonio.
- Las proteínas que se han considerado como estándares de las proteínas que constituyen las EPS, es decir, BSA, caseína, lisozima y hemoglobina.
- Combinación de BSA con alginato de sodio, seleccionados como los principales componentes de las EPS (proteína y carbohidrato, respectivamente).

3.5. TAMAÑO DE PARTÍCULA

Para la determinación del tamaño de partícula del licor de mezcla del MBR se ha utilizado el equipo MASTERSIZER 2000 de Malvern Instruments (Figura III.14). El equipo utiliza la tecnología de Difracción Láser y tiene un rango de medida de 0.02 a 2000 micras [16]. La difracción láser mide las distribuciones de tamaño de partícula a partir de la variación angular de la intensidad de luz dispersada cuando un rayo láser pasa a través de una muestra de partículas dispersas. Las partículas grandes dispersan la luz en ángulos pequeños en relación con el rayo láser y las partículas pequeñas dispersan la luz en ángulos grandes. El tamaño de las partículas se calcula mediante la teoría Mie de la dispersión de la luz. El tamaño de partículas se registra como un diámetro de esfera equivalente al volumen, es decir, si mi partícula fuera una esfera qué diámetro tendría.

Para insertar la disolución de licor de mezcla se ha utilizado la unidad de dispersión para vía líquida Hydro 2000 MU, también de Malvern Instruments.



Figura III.14: Equipo de medición del tamaño de partículas. Mastersizer 2000

El equipo cuenta con un software específico para procesar los resultados, se ha utilizado la versión V.5.22.

3.6. DETERMINACIÓN DE LAS RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN

Para la determinación de las resistencias a la filtración por membrana es necesario realizar tres ensayos con una planta piloto de ultrafiltración. En primer lugar se realiza un ensayo de la permeabilidad al agua de la membrana, a continuación se realiza un ensayo de ensuciamiento con el licor de mezcla procedente del MBR como alimento y finalmente, tras enjuagar la membrana con agua de red, un ensayo de permeabilidad al agua para comprobar el estado en el que ha quedado la membrana tras el ensuciamiento y posterior enjuague.

Para ello, se ha utilizado una planta piloto a escala de laboratorio. En la Figura III.15 se presenta un esquema detallado de la planta de UF, mostrando todos los elementos que la componen.

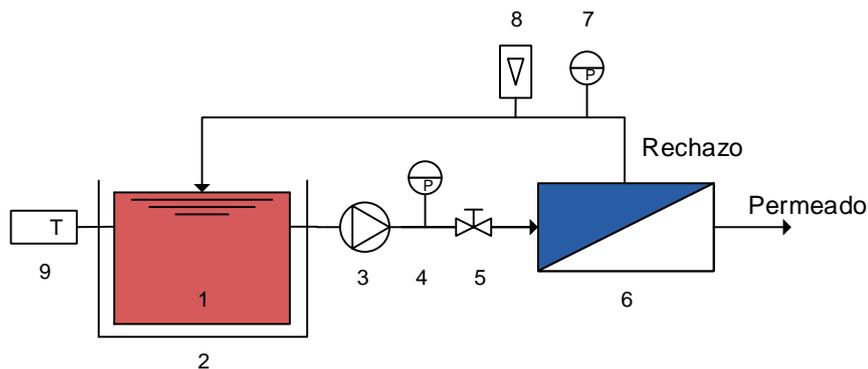


Figura III.15: Esquema de una planta de UF

La corriente de alimento que entra en el módulo de membrana se divide en una corriente de rechazo y una corriente de permeado. Salvo que se tome medida del caudal de permeado, ambas corrientes se recirculan al tanque de alimentación para trabajar con concentración constante.

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

1. Tanque de alimentación.
2. Baño termostático.

Material y Métodos

3. Bomba peristáltica de velocidad variable de la marca Masterflex, modelo 7591-07.
4. Manómetro de entrada marca Nuovafima de 0 a 1,6 bar.
5. Válvula reguladora de presión.
6. Módulo de membranas de filtración tangencial Rayflow[®] 100 de ORELIS (Francia).
7. Manómetro de salida marca Nuovafima de 0 a 1,6 bar.
8. Rotámetro marca Tecfluid de rango 25-250 L/h.
9. Termómetro del baño.

En la Figura III.16 se muestra el módulo de filtración Rayflow[®] 100 utilizado en los ensayos de laboratorio. Las dimensiones del módulo son aproximadamente 400 mm².

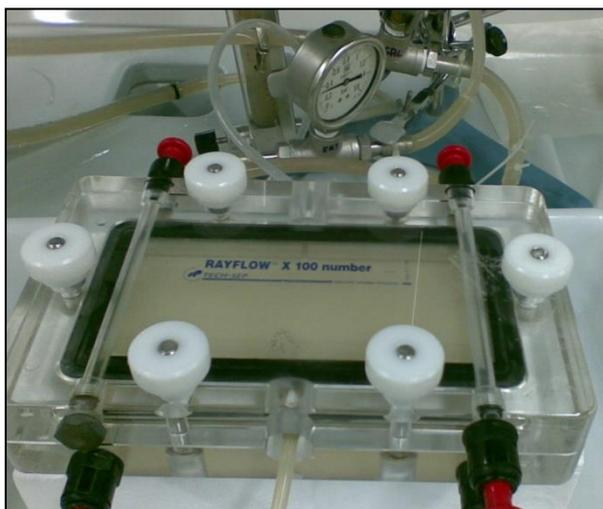


Figura III.16: Módulo Rayflow[®]

Las especificaciones del módulo se describen a continuación en la Tabla III.2.

Tabla III.2: Características del módulo RayFlow® 100

RAYFLOW®	
Superficie activa de la membrana	100 cm ²
Presión de operación	0-3 bar
Caudal de alimentación	0 – 500 L/h
Velocidad tangencial	1,7 m/s para 250 L/h 3,5 m/s para 500 L/h
Peso	2.5 kg
Material	Metacrilato

La membrana de ultrafiltración utilizada, tipo plana, es de uso común en biorreactores de membrana. El fabricante es Microdyn Nadir y sus propiedades se encuentran descritas en la Tabla III.3.

Tabla III.3: Propiedades de la membrana

Parámetro	Valor
Material de la membrana	Polietersulfona hidrofílica (PES)
Tamaño de poro	0.04 µm
MWCO	150 kDa
Rango de pH	2 - 11
Rango de temperatura	5 – 55°C
Presión de operación	30 - 400 mbar
Presión de contraalado	Máximo 150 mbar

Antes de realizar el ensayo con la membrana esta se somete a un enjuague para eliminar el producto de conservación con el que viene de fábrica.

Material y Métodos

El modelo matemático más utilizado para determinar el ensuciamiento de las membranas es el **modelo de resistencias en serie**. Según este modelo, la dependencia del caudal de filtración con la presión transmembranal (PTM) aplicada se expresa a través de una serie de resistencias cuyo cálculo se realiza de forma experimental de acuerdo con el procedimiento descrito por Bae y Tak [17].

Para el cálculo de la resistencia total, se ha de calcular la resistencia intrínseca de la membrana (R_m), la resistencia debida a la capa de torta que se forma sobre la superficie de la membrana, la cual tras un aclarado con agua se puede eliminar (R_{rev}), y la resistencia causada por la adsorción de soluto en el interior de los poros y paredes de la membrana (R_{irrev}), la cual permanece tras el aclarado con agua. La suma de estas tres resistencias (Ec. III.13) se define como la resistencia total (R_T) e indica la mayor o menor resistencia que opone el fango a ser filtrado por una membrana.

$$R_T = R_m + R_{rev} + R_{irrev} \quad (\text{Ec. III.13})$$

Los pasos a seguir a nivel experimental se detallan a continuación:

A. Medida de la permeabilidad al agua destilada para determinar R_m :

1. Se llena el depósito de alimentación con agua destilada.
2. Se conecta la bomba de alimentación y se establece un caudal de 50 L/h mediante el variador de frecuencia de la bomba.
3. Se fija una PTM de 0.1 bar por medio de una válvula de estrangulamiento situada en el tubo de permeado.
4. Transcurridos 15 minutos (tiempo en el que se considera que se ha alcanzado el estado estacionario) se mide el caudal de permeado.
5. Se repite este procedimiento a 0.2, 0.3 y 0.4 bar.

6. Se representa J_w vs PTM y se comprueba que se obtiene un buen coeficiente de regresión. Se toma el valor del flux correspondiente a la medida de 0.3 bar como referencia, ya que el ensayo de ensuciamiento se realiza a ésta presión. El flujo de permeado obtenido filtrando agua J_w se calcula mediante (Ec. III.14):

$$J_w = \frac{V_p}{A \cdot t} \quad (\text{Ec. III.14})$$

Donde,

V_p	Volumen permeado (L)
A	Área efectiva de membrana (m^2)
t	Tiempo (s)

7. En caso de que el ajuste obtenido no sea bueno, se debe desestimar el recorte de membrana y sustituirlo por uno nuevo.

R_m , expresada en m^{-1} , se calcula mediante la siguiente ecuación (Ec. III.15):

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

Donde,

PTM	Presión transmembranal (bar)
μ	Viscosidad a la temperatura de trabajo (Pa·s)
J_w	Flujo de permeado utilizando agua destilada en el ensayo ($L/m^2 \cdot h$)

B. Medida del flujo de permeado que ofrece la membrana una vez circula el licor de mezcla, cálculo de R_{rev} :

1. Se llena el depósito de alimentación con la muestra de licor de mezcla.

Material y Métodos

2. Se conecta el baño térmico para minimizar la influencia de la temperatura manteniéndola constante ($T \sim 20^\circ$).
3. Se conecta la bomba de alimentación y se establece un caudal de 50 L/h.
4. Se fija una PTM de 0.3 bar mediante la válvula de estrangulamiento situada en el tubo de permeado.
5. Cada minuto se mide el caudal de permeado, para ello se vierte el permeado en un recipiente situado sobre una balanza Kern KB (previamente tarada) y se anota el valor del peso.
6. Una vez alcanzado el valor estacionario, es decir el caudal de permeado permanece constante, (aproximadamente tras 1h de ensayo) se para el ensayo. Con el dato de caudal de permeado en el estacionario se calcula J_{AS} teniendo en cuenta la superficie de la membrana (100 cm^2).

R_{rev} se obtiene mediante la siguiente ecuación (Ec. III.16):

$$R_{rev} = \frac{PTM}{\mu \cdot J_p} - R_m - R_{irrev} \quad (\text{Ec. III.16})$$

Siendo,

J_p Flujo de permeado filtrando fango activo en el ensayo ($\text{L/m}^2 \cdot \text{h}$).

$$J_p = \frac{V_p}{A \cdot t} \quad (\text{Ec. III.17})$$

C. Limpieza del sistema con agua destilada

1. Se llena el depósito de alimentación con agua destilada.

2. Se conecta la bomba de alimentación y se establece un caudal de 50 L/h.
3. Se abre totalmente la válvula de estrangulamiento situada en el tubo de rechazo para no ejercer presión sobre la membrana.
4. Se deja el sistema sin presión durante unos 15 minutos de forma que se vaya limpiando la superficie de la membrana.

D. Medida de la permeabilidad de la membrana al agua destilada para determinar R_{irrev} :

1. Se llena el depósito de alimentación con agua destilada.
2. Se conecta la bomba de alimentación y se establece un caudal de 50 L/h.
3. Se fija una PTM de 0.3 bar regulando la válvula de estrangulamiento situada en el tubo de permeado.
4. Transcurridos 15 minutos (tiempo en el que se considera que se ha alcanzado el estado estacionario) se mide el caudal de permeado y se anota el valor obtenido. Con el dato de caudal de permeado en el estacionario se calcula J_w .

R_{irrev} se obtiene mediante la siguiente ecuación (Ec. III.18):

$$R_{irrev} = \frac{PTM}{\mu \cdot J_w} - R_m \quad (Ec. III.18)$$

Donde,

J_w : flux de permeado después de la limpieza ($L/m^2 \cdot h$)

3.7. ULTRAFILTRACIÓN DEL LICOR DE MEZCLA EN LABORATORIO

La planta utilizada para este ensayo es la descrita en el punto anterior (Figura III.15), al igual que la membrana de UF (Tabla III.3).

Este ensayo se ha realizado con el fin de comparar la evolución de los flujos de permeado obtenidos cuando se filtran las muestras de licor de mezcla procedentes de las 2 EDAR industriales. Para ello, se ha realizado un ensayo de filtración con cada muestra de licor de mezcla. Además, en cada ensayo se ha utilizado un recorte de membrana nuevo, de modo que no interfiera el ensuciamiento residual de la membrana en el flujo de permeado.

Los ensayos se llevaron a cabo a un presión transmembranal de 1 bar, 25°C de temperatura y manteniendo una velocidad tangencial de 2 m/s mediante una bomba de velocidad variable. La duración de cada ensayo fue la necesaria para alcanzar el estado estacionario (flujo constante). La duración mínima considerada fue de 2 h. Los experimentos se llevaron a cabo recirculando tanto la corriente de rechazo como la corriente de permeado al tanque de alimentación. El flujo de permeado (J_p) se midió gravimétricamente con una balanza electrónica (KERN KB 2400-2N, precisión 0,01 g, Alemania) conectada a un ordenador con un software de adquisición de datos (Balance Connection SCD-4.0, Kern®). Los datos se registraron en el ordenador cada minuto. El flujo de permeado se controló a lo largo de los experimentos de UF de acuerdo con la (Ec. III.17), para determinar la caída del flujo a medida que se ensuciaba la membrana.

3.8. ULTRAFILTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS EN LABORATORIO

A diferencia de la planta utilizada en los ensayos anteriores, en este caso la planta trabajaba manteniendo una densidad de flujo de permeado constante y variando la presión.

Los ensayos se llevaron a cabo usando un material de membrana de plana de polivinildifluoruro (PVDF) de ultrafiltración con un tamaño de poro nominal de 80 nm.

La membrana de PVDF se ensayó en un módulo de filtración de flujo cruzado de metacrilato, con un ancho de canal fijo de 0.09 m, longitud 0.17 m y altura 0.009 m, dando una superficie de membrana activa de 0.0153 m². El alimento a ultrafiltrar se almacenó en un recipiente agitado de 1 litro, a partir del cual este se bombeó usando una bomba peristáltica (Watson Marlow, 500 Series, Falmouth, UK). La temperatura se mantuvo aproximadamente constante a 20°C. Tanto el permeado como el rechazo se alimentaron de nuevo al depósito de alimentación para mantener el volumen y concentración constante.

Cada ensayo de permeabilidad se llevó a cabo durante 3 h a una velocidad de flujo cruzado fija de 0.011 m/s y un flujo fijo de 20 L/m²·h. Para estas condiciones, se obtuvo un número de Reynolds (Re) de 179 indicando condiciones laminares. La presión transmembranal se determinó mediante un balance de presión utilizando transductores de presión situados antes y después de la corriente de rechazo (0-1 bar, RM&C, Sheffield, UK) y un transductor para la presión de vacío colocado en el lado del permeado (-0.5 a 0.5 bares, RM&C, Sheffield, Reino Unido). La señal de salida 0-5 V se registró utilizando un convertidor analógico de 16 bits a un convertidor digital (Pico Technology Ltd., St Neots, Reino Unido). La sensibilidad del transductor de presión fue certificada por el fabricante en menos del 0,25% de rango.

Después de realizar el ensayo de ensuciamiento, la membrana se limpió durante con una solución de hipoclorito de sodio (500 mg/L). Después de la limpieza química, la membrana se enjuagó usando agua ultrapura, y después se sometió a filtración con agua ultrapura manteniendo un flujo de 20 L/m²·h durante al menos 45 min para minimizar el residuo químico y para medir la permeabilidad al agua limpia para asegurar una recuperación eficiente antes del siguiente ensayo.

4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL LICOR DE MEZCLA

4.1. DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (EPS) Y PRODUCTOS SOLUBLES MICROBIANOS (SMP)

Tal y como se ha descrito en la introducción (Apartado 3.6), las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) están formadas por los compuestos solubles microbianos (SMP) y las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS).

$$\text{EPS} = \text{SMP} + \text{eEPS}$$

Los productos solubles microbianos (SMP) se generan debido a procesos de hidrólisis y difusión que tienen lugar en las células bacterianas. Se encuentran en el sobrenadante del licor de mezcla y con una centrifugación se separan fácilmente del resto de componentes del licor de mezcla. En cambio, las eEPS se encuentran en la superficie de la membrana celular y se obtienen tras someter el fango a un proceso de extracción. La extracción debe ser moderada, ya que si ésta es agresiva puede llegar a producirse la ruptura de la membrana celular extrayéndose, además de las proteínas y carbohidratos, ADN, ácidos húmicos y ácido urónico que interferirán en las medidas de proteínas y carbohidratos.

Para extraer las sustancias poliméricas extracelulares (eEPS) se han aplicado varios métodos, los cuales se resumen en la Figura III.17. Algunos de estos métodos constan de varias etapas, por lo que la suma de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas es la suma de las extraídas en cada etapa (EPS 1 + EPS 2).

Los métodos de extracción que se han utilizado son métodos físico-químicos, que bien emplean una resina de intercambio catiónico (Dowex® Marathon™ C en forma sódica de Sigma-Aldrich) o bien un detergente, el Triton® X-100 (Panreac). Estos métodos se combinan con la aplicación de esfuerzos cortantes a través de la agitación o la homogeneización.

El método de extracción con la resina es el que más ampliamente se ha utilizado. Este proceso de extracción se basa en el intercambio iónico. La biomasa microbiana y las EPS se encuentran unidas mediante metales divalentes a través de la formación de complejos. Mediante la extracción de algunos de los cationes que mantienen la estructura de la matriz de las EPS, como son el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , se consigue la desintegración de las EPS. Estos cationes pueden ser extraídos con la resina de intercambio iónico. Por otro lado, el Triton X-100 es un tensoactivo no iónico, que se utiliza para solubilizar las proteínas (sin llegar a desnaturalizarlas).

En los procesos de extracción en 2 etapas se ha trabajado con el fango diluido a una concentración de 1 gSSV/L para evitar interferencias de sustancias que pueda contener el fango [18] y, además, para que la comparación entre muestras pueda ser más representativa. En el método Ultra-Turrax + CER se ha trabajado con el fango sin diluir para replicar el protocolo establecido por Wingender et al. (2009) [19]. A la hora de realizar los cálculos, se ha tenido en cuenta el factor de dilución aplicado para determinar el contenido real de proteínas o carbohidratos en la muestra.

Las muestras de fango activo se han mantenido a una temperatura de 4°C durante la aplicación de todos los protocolos de extracción de EPS.

Material y Métodos

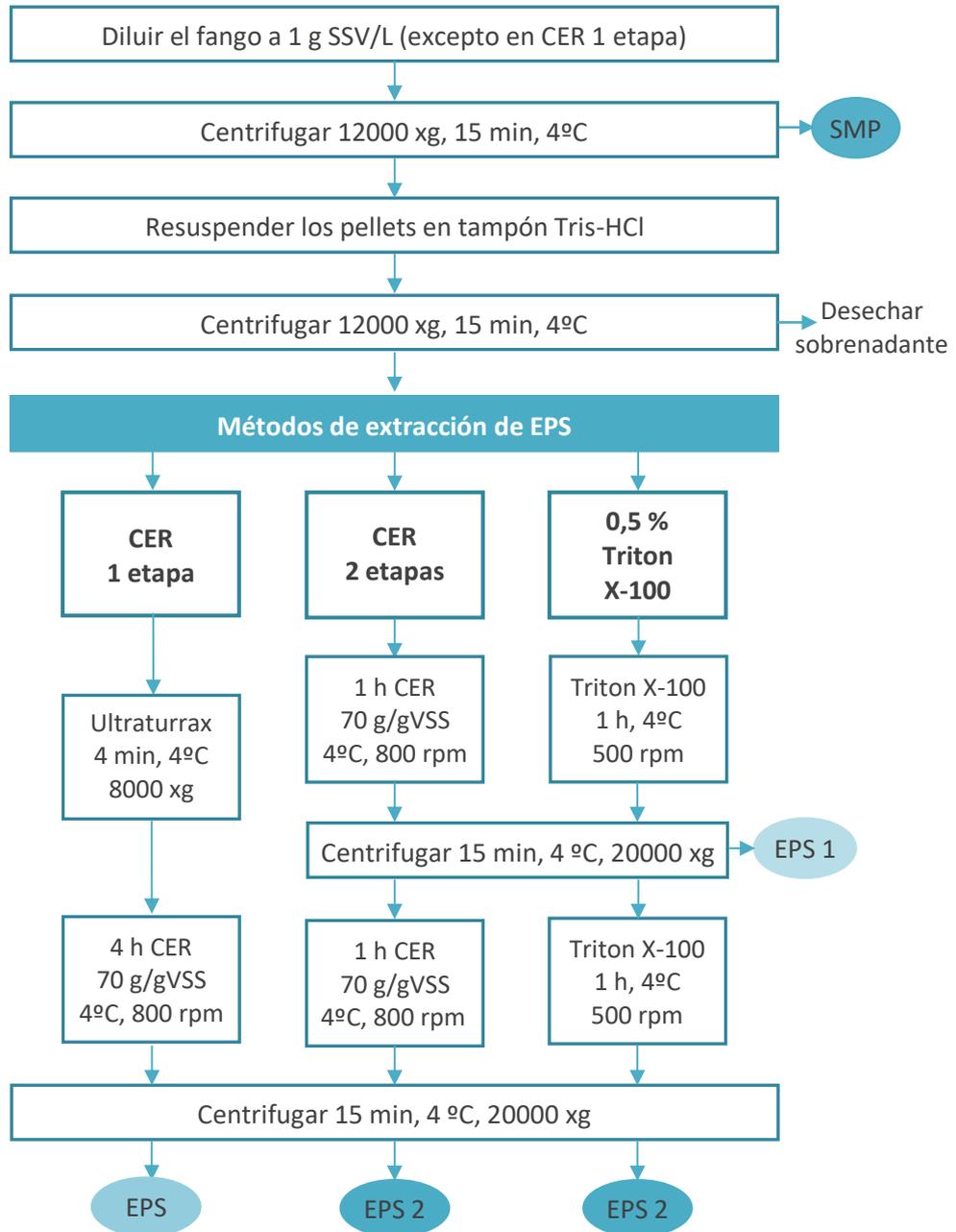


Figura III.17: Esquemas de extracciones de EPS con resina CER y con Triton X-100

4.1.1. Método de extracción con la resina CER en 2 etapas

En la Figura III.18 se resume el método utilizado para realizar la extracción de EPS. Este método está basado en el descrito por Frolund et al. (1996) [20] y Ras et al. (2008) [18].

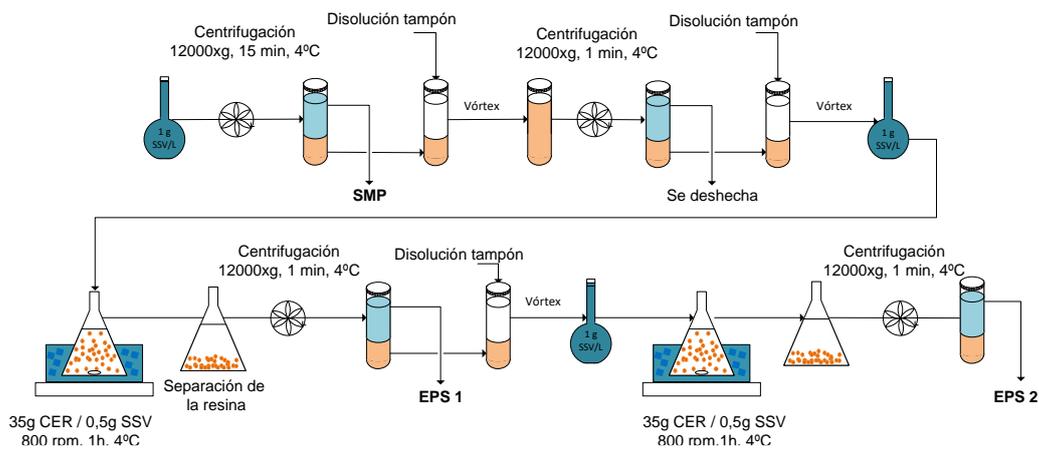


Figura III.18: Esquema de extracción de EPS con el método CER en 2 etapas

Material y reactivos:

- Centrífuga refrigerada SIGMA 3-18K
- Tubos de centrífuga de PC de 30 mL de Nalgene®
- Vasos de precipitados
- Erlenmeyers de 250 mL
- Matraz de 200 mL
- Placa agitadora + imanes
- Vórtex
- Cristalizadores
- Papel de aluminio
- Bolsas de hielo

Material y Métodos

- Tampón 10 mmol/L Tris-Hidroximetil aminometano ajustado a pH 8 con HCl (Tris-HCl)
- Filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 μm de Sartorius 16555-100
- Resina CER DOWEX® Marathon™ C (Sigma Aldrich, Ref: 91973)

Procedimiento:

1. En primer lugar se prepara la resina: se pesan aproximadamente 28 g de resina CER DOWEX®, dado que luego se lavará y pesará más. Se le adicionan 100 mL de tampón Tris-HCl y se deja en agitación durante 1h, tapada con papel de aluminio para mantener en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se filtrará con papel de filtro.
2. Se diluye la muestra de fango con tampón Tris-HCl a una concentración de 1 gSSV/L para evitar interferencias con los ácidos húmicos [18].
3. Se centrifuga la disolución a 12000 xg y 4°C durante 15 min. En la Figura III.19 se muestra la centrifuga utilizada en el laboratorio.



Figura III.19: Centrifuga refrigerada

4. Se separa el sobrenadante del pellet formado tras la centrifugación (Figura III.20), ya que contiene los productos solubles microbianos (**SMP**). El sobrenadante se filtra con un filtro

de jeringa para eliminar posibles partículas que puedan interferir en el posterior análisis de la muestra. Se almacena en el congelador a -20°C hasta su análisis.



Figura III.20: Separación de fases tras centrifugación

5. Se juntan los pellets restantes, se añade tampón Tris-HCl y se homogenizan con el vórtex. De esta forma, se elimina de los pellets posibles restos de SMP.
6. Se centrifuga de nuevo a 12000 xg y 4°C durante 15 min.
7. Se desecha el sobrenadante.
8. Se disuelven los pellets con Tris-HCl, volviendo al volumen de partida para mantener la misma concentración de SSV.
9. Se pesa la cantidad necesaria de resina preparada anteriormente (paso 1) y se adiciona en los erlenmeyers (para las 2 etapas. La relación resina CER/SSV es $35 \text{ g CER}/0,5 \text{ g SSV}$).
10. Se añade al primero de los erlenmeyers la disolución anterior del pellet lavado con Tris-HCl y se deja en agitación con hielo durante 1h a 800 rpm y 4°C . En la Figura III.21 se observa cómo se realiza el proceso de extracción con la resina.



Figura III.21: Proceso de extracción de EPS mediante la resina CER

11. Transcurrida la hora se centrifuga el contenido del erlenmeyer.
12. Se guarda el sobrenadante a -20°C , contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (**eEPS 1**). Previamente a su congelación, la muestra se filtra con filtro de jeringa para eliminar partículas.
13. En la Figura III.22 se muestra el tipo de filtro de jeringa utilizado (acetato de celulosa de $0,45\ \mu\text{m}$) y los tubos en los que se almacena el extracto obtenido.



Figura III.22: Filtración del extracto previo al almacenamiento a -20°C

14. Se juntan los pellets anteriores disolviéndolos con Tris-HCl y se enrasan en el matraz aforado con tampón para mantener la concentración inicial.
15. A continuación, se añade el contenido del matraz anterior en el segundo erlenmeyer (del paso 9) que contiene la resina.
16. Se deja en agitación con hielo durante 1h a 800 rpm y 4°C.
17. Se centrifuga el contenido del erlenmeyer a 12000 xg y 4°C durante 15 min.
18. Se guarda el sobrenadante a -20°C, contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas en la segunda extracción (**eEPS 2**). Previamente a su congelación, la muestra se filtra con un filtro de jeringa para eliminar partículas.

En la Figura III.23, se observa el extracto obtenido tras las dos extracciones. Las sustancias poliméricas extracelulares eEPS totales serán la suma de las extraídas en ambas etapas eEPS 1 + eEPS 2.



Figura III.23: Muestras de EPS obtenidas tras las extracciones con resina CER

Material y Métodos

4.1.2. Método de extracción con la resina CER en 1 etapa

Este método está basado en el descrito por Frolund et al. (1996) [20] y Wingender et al. (1999) [19]. La principal diferencia respecto al método anterior es que la extracción con la resina de intercambio iónico se realiza en una sola etapa de mayor duración y se trabaja con el fango sin diluir (100 mL de muestra). Por otro lado, también se realiza una dispersión de la biomasa con un homogeneizador. El método se resume en la Figura III.24.

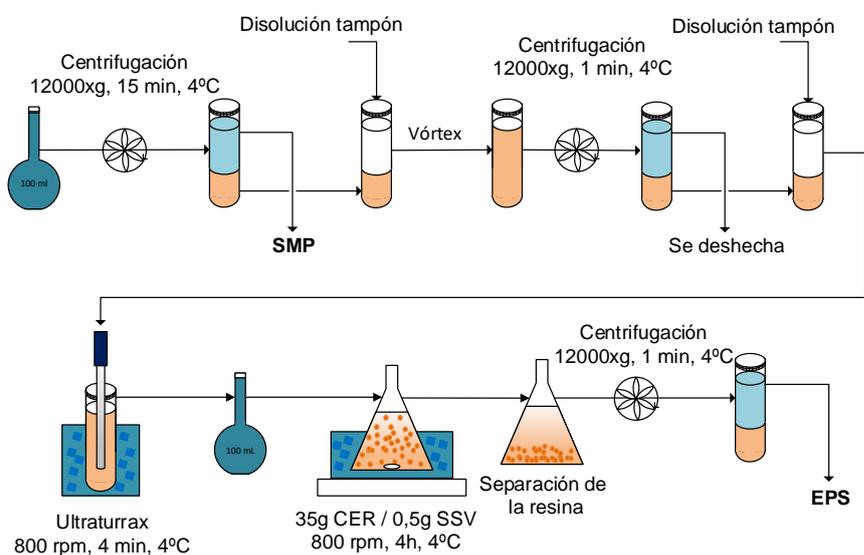


Figura III.24: Esquema de extracción de EPS con Homogeneizador + CER

Los materiales y reactivos utilizados en este método son los mismos que los descritos en el apartado 4.1.1. Además, se incluye el homogeneizador Ultra-Turrax IKA T-25, utilizado para facilitar la extracción físicamente.

Procedimiento:

El procedimiento de separación de los productos solubles microbianos (SMP) es el mismo que el descrito en el caso anterior, por lo que se repiten

los Pasos 1-8, en los que se separan los SMP y se homogenizan los pellets con Tris-HCl para seguir con la extracción de EPS. A continuación:

1. Se junta la biomasa anterior en un mismo tubo Falcon® y se coloca en el homogeneizador Ultra-Turrax durante 4 min a 8000 rpm. Alrededor del tubo se coloca una bolsa de hielo para mantener el fango refrigerado.
2. Se vierte la biomasa homogeneizada en uno de los erlenmeyers que contiene la resina (preparado anteriormente).
3. Se coloca el erlenmeyer en un cristalizador rodeado de hielo y se coloca en la base agitadora. Se agita durante 4h a 4° C y 800 rpm.
4. Se centrifuga el contenido del erlenmeyer.
5. Se guarda el sobrenadante a -20°C, contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (**EPS**). Previamente a la congelación de la muestra, ésta se filtra con filtro de jeringa para eliminar partículas.

4.1.3. Método de extracción con el detergente Triton® X-100

En la Figura III.25 se resume el método utilizado para realizar la extracción de EPS con Triton® X-100 (C₃₄H₆₂O₁₁). Este método está basado en el publicado por Ras et al. (2008) [18].

Material y Métodos

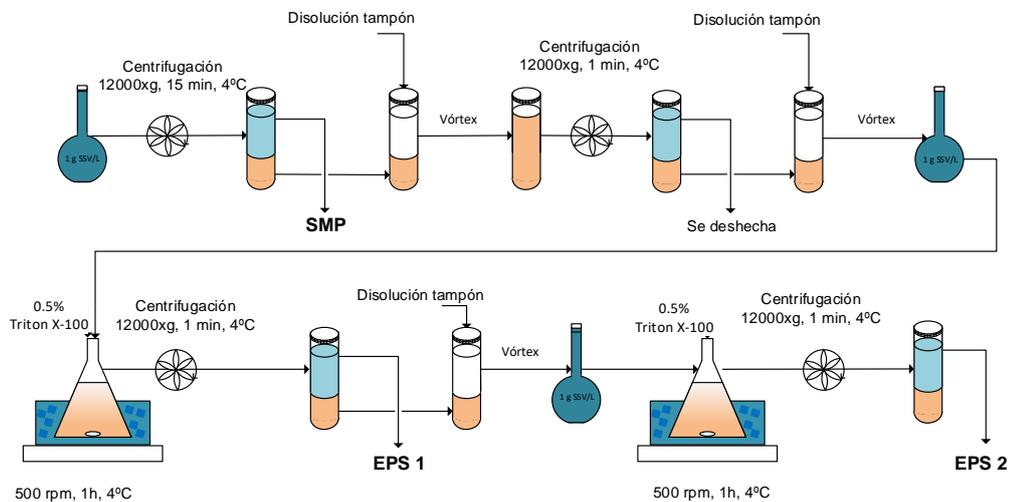


Figura III.25: Esquema de extracción de EPS con el método Triton® X-100

Los materiales necesarios para la extracción son los mismos que los descritos en el apartado 4.1.1, salvo que en lugar de utilizar la resina, en este caso se utilizará el detergente Triton® X-100 de Panreac.

Procedimiento:

El procedimiento de separación de los productos solubles microbianos (SMP) es el mismo que el realizado en el apartado 4.1.1, por lo que se repiten los Pasos 2-8, en los que se separan los SMP y se homogenizan los pellets con Tris-HCl para seguir con la extracción de EPS. A continuación:

1. Se añade al erlenmeyer la cantidad de Triton X-100 necesaria para tener una concentración del 0.5% (este paso se realizará 2 veces, para las 2 etapas). Debido a su viscosidad es mejor pesarlo que pipetearlo. Por cada 100 mL de muestra se pesarán 0.53 g de Triton X-100, teniendo en cuenta que su densidad es de $\rho_{\text{Triton}} = 1,06 \text{ g/mL}$.

2. Se añade al primero de los erlenmeyers la disolución de 1 gSSV/L del pellet previamente lavado y resuspendido con Tris-HCl y se deja en agitación con hielo durante 1h a 500 rpm y 4°C.
3. Transcurrida la hora se centrifuga el contenido del erlenmeyer a 12000 xg y 4°C durante 15 min.
4. Se guarda el sobrenadante a -20°C, contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (**eEPS 1**). Previamente a su congelación, la muestra se filtra con un filtro de jeringa para eliminar partículas.
5. Se juntan los pellets anteriores disolviéndolos con Tris-HCl y se enrasan de nuevo en el matraz aforado.
6. A continuación, se añade el contenido del matraz anterior en el segundo erlenmeyer (del paso 1) que contiene el Triton X-100.
7. Se deja en agitación con hielo durante 1h a 500 rpm y 4°C.
8. Se centrifuga el contenido del erlenmeyer a 12000 xg y 4°C durante 15 min.
9. Se guarda el sobrenadante a -20°C, contiene las sustancias poliméricas extracelulares extraídas en la segunda extracción (**eEPS 2**) (Figura III.26). Previamente a su congelación, la muestra se filtra con un filtro de jeringa para eliminar partículas.



Figura III.26: Muestras de EPS obtenidas tras las extracciones con Triton X-100

Material y Métodos

Los eEPS totales extraídos serán la suma de eEPS 1 + eEPS 2. Se observa que el aspecto de la muestra tras la primera extracción es más coloreado debido a la mayor concentración de proteínas y carbohidratos.

4.2. EXTRACCIÓN DE EPS Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Para la purificación de proteínas interesaba realizar una extracción de EPS que extrajera la mayor concentración de proteínas posible. Para ello, se realizaron diferentes etapas de extracción, seguidas de la purificación con sulfato amónico.

En primer lugar se separaron los productos solubles microbianos y se resuspendió el pellet con tampón PBS, tal y como se ha descrito en las extracciones anteriores. El procedimiento de separación de los SMP es el mismo que el realizado en el apartado 4.1.1, por lo que se repiten los Pasos 1-8. A continuación, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

1. Extracción básica: se resuspende el pellet con NaCl 10 mM y se ajusta el pH a 10.5 con NaOH 1M. Se agita durante 30 min a 4°C en atmósfera de N₂.
2. Extracción térmica seguida de resina de intercambio catiónico CER: se mantiene la muestra a 105 °C durante 20 min. A continuación, se adiciona tampón PBS hasta recuperar el volumen evaporado y se añade resina CER. Se mantiene en agitación durante 1h a 4°C.
3. Extracción con resina CER. Se mantiene en agitación durante 1h a 4°C.

Después de cada etapa el pellet obtenido tras la centrifugación se disuelve con tampón PBS. Finalmente, los eEPS obtenidos se filtran con filtro de jeringa de 0.45 µm.

La solubilidad de las proteínas depende de la fuerza iónica del medio. A medida que aumenta la concentración salina del medio, las proteínas

disminuyen su solubilidad, se agregan y precipitan, es el fenómeno conocido como *salting-out* [21,22].

Con el fin de separar las proteínas de las EPS extraídas del fango activo y así conocer mejor la composición de las EPS, se realiza una purificación (o también llamado fraccionamiento) de las proteínas con sulfato amónico ((NH₄)₂SO₄) [23].

En la Figura III.27 se muestra el protocolo para la purificación de proteínas con sulfato amónico. En un primer lugar se validó el método utilizando las siguientes proteínas sintéticas: albúmina de suero bovino (BSA), lisozima, hemoglobina y caseína. Una vez estudiadas estas 4 proteínas, se realizó el método con las EPS extraídas.

Procedimiento:

1. Se prepara una concentración de proteína de 400 mg/L (BSA, lisozima, hemoglobina o caseína), en un volumen de 50 mL.
2. Se agita el vaso de precipitados y se refrigera con hielo para mantener la temperatura a 4°C y así garantizar la estabilidad de las proteínas.
3. Se añade lentamente el (NH₄)₂SO₄ (fase sólida) hasta alcanzar un porcentaje de saturación deseado (Tabla III.4).
4. Se mantiene en agitación durante 1h a 500 rpm y 4°C.
5. A continuación la muestra se centrifuga a 4800 xg y 4°C.
6. Se almacena 1 mL de sobrenadante para su posterior análisis de proteínas. El método utilizado fue el de Lowry (descrito en 4.4.3).
7. Se separa el pellet formado, si lo hubiera.
8. A continuación, se añade una cantidad adicional de (NH₄)₂SO₄ para aumentar la saturación. En la Tabla III.4 se muestra el % de saturación (NH₄)₂SO₄ y la cantidad a adicionar a la disolución para incrementar la saturación. Nota: 1 gr de (NH₄)₂SO₄ aumenta el volumen de la disolución 0.54 mL.

Material y Métodos

Tabla III.4: Porcentaje de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cantidad a adicionar

% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0	20	40	60	70	75	80	85	90	95
gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	5.3	5.86	6.48	3.5	1.84	1.84	1.89	1.95	1.95

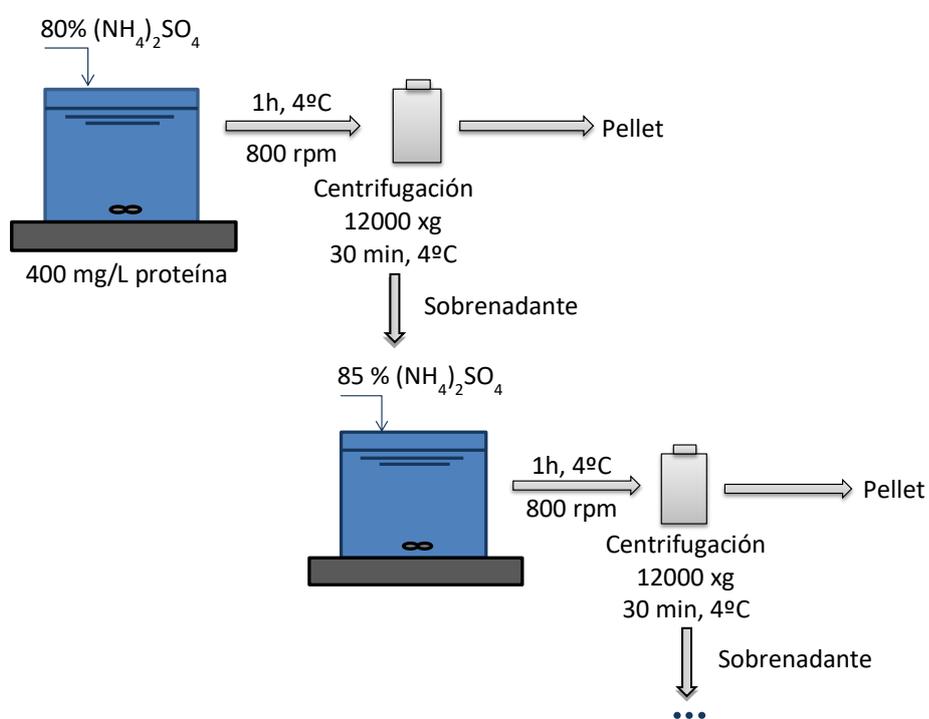


Figura III.27: Procedimiento para la purificación de proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

4.3. MÉTODO DE ADICIÓN ESTÁNDAR

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

1. Establecer las concentraciones de patrón a añadir a la muestra, de modo que estén dentro de la recta de calibrado.
2. Fijar un volumen de muestra (alícuota), tal que, en función del volumen total, dará un factor de dilución.

$$f_{dilución} = \frac{V_{total}}{V_{alícuota}} \quad (Ec. III.19)$$

3. Preparar una disolución madre partiendo de BSA o glucosa, en función de si se analizan proteínas o carbohidratos, respectivamente.
4. En función de la concentración de la disolución antes preparada y del volumen total de muestra que se quiera tener se calcula el volumen a adicionar de cada patrón.
5. El volumen de tampón Tris-HCl se calcula por diferencia entre el volumen total y la suma del volumen del patrón y alícuota. En la Tabla III.5 se muestra un ejemplo de los volúmenes que se deberían tomar para la aplicación de método de adición estándar para analizar las proteínas por el método BCA, el cual se describe en el apartado 4.4.1.

Tabla III.5: Método de adición estándar: ejemplo determinación de proteínas

$C_{patrón}(mg/L)$	0	50	100	200
$V_{muestra}(μL)$	1000	1000	1000	1000
$V_{patrón, BSA}(μL)$	0	250	500	1000
$V_{Tris-HCl}(μL)$	1000	750	500	0
$V_{TOTAL}(μL)$	2000	2000	2000	2000

Material y Métodos

6. Representar gráficamente la absorbancia (medida a 562 nm en el caso de las proteínas) frente a la concentración de BSA y ver si la recta de la adición estándar es paralela o no a la recta de calibrado (RC). En la Figura III.28 se muestra un ejemplo.
- Si ambas rectas son paralelas significa que no hay interferencia entre la muestra y el método analítico.
 - Si las rectas se cruzan en la zona positiva del gráfico la interferencia es restrictiva, es decir, se detecta menos color y, por tanto, menos concentración de proteínas o carbohidratos.
 - Si se cruzan en la zona negativa, la interferencia será aditiva, es decir, la concentración obtenida es mayor que la real.

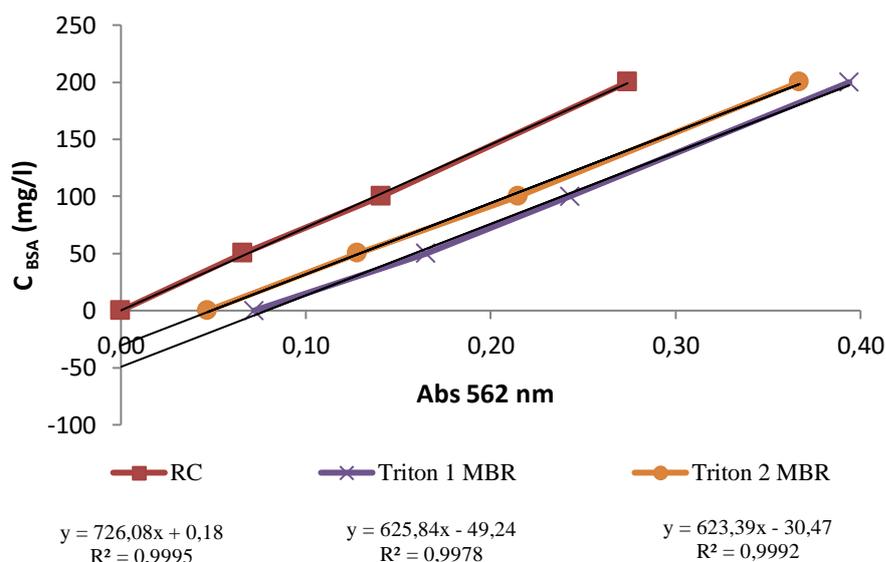


Figura III.28: Método Adición estándar: Ejemplo método BCA

En la Figura III.28 se observa la representación de las rectas de adición estándar y la recta de calibrado para el caso de una muestra de fango de MBR sometida a un proceso de extracción con 0.5% Triton X-100. Se observa que las rectas obtenidas con la adición estándar son paralelas a la recta de

calibrado, lo que indica que no existe interferencia entre el método analítico y las muestras de fango analizadas. El desplazamiento horizontal de las rectas desde la ordenada en el origen indica las distintas concentraciones de BSA para cada muestra.

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

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

4.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Para seleccionar el método de cuantificación de proteínas se ha realizado un estudio del estado del arte destacando los siguientes artículos o libros [24–26].

De cada muestra se analizarán los eEPS y SMP por triplicado para asegurar la fiabilidad de los resultados.

4.4.1. Método BCA

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

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



El método tiene pocas interferencias y es insensible a detergentes como el detergente Triton® X-100 hasta concentraciones del 5% [27].

Material y reactivos:

- Micropipeta de 10 a 100 μL y micropipeta de 100 a 1000 μL
- Eppendorfs de 1 mL porta eppendorfs
- Agitador vórtex
- Base agitadora magnética e imán
- Baño termostático a 37^o C
- H₂O ultrapura
- Disolución tampón Tris-HCl 10mmol/L
- Kit BCA, de Novagen:
 - 3 x 1 mL albúmina de suero bovino estándar (conocida como BSA) en concentración de 2 mg/mL
 - Disolución BCA 500 mL
 - 15 mL sulfato cúprico al 4%
- Espectrofotómetro Hach-Lange DR 5000 y cubetas

Procedimiento:

1. Se enumeran los eppendorfs.
2. Se enciende el espectrofotómetro 15 minutos antes de empezar a trabajar con él para que se caliente la lámpara.
3. Se preparan las muestras para realizar la recta de calibrado. Se realizará el método “Enhanced Assay” del kit BCA de Novagen, aplicado a un rango de concentraciones entre 0 y 250 mg/L de proteína BSA.
4. Se prepara la disolución “BCA Working Reagent”: se mezclan 10 mL de solución BCA + 200 μL de disolución de sulfato cúprico al 4% y se agita con el agitador magnético.
5. Se pipetea 50 μL de cada estándar preparado (para la recta de calibrado) y/o muestra a analizar en los eppendorfs previamente marcados.

Material y Métodos

6. Se añade 1 mL de "BCA Working Reagent" a los eppendorfs anteriores y se agitan en el vórtex.
7. Se introducen los eppendorfs en el baño a 37 °C durante 30 minutos (Figura III.29).



Figura III.29: Baño a 37° C con los eppendorfs sumergidos

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

En la Figura III.30 se observa como las muestras de mayor concentración de proteína presentan un color violeta más intenso.



Figura III.30: Aspecto de las muestras de la recta de calibrado a la salida del baño

9. Se lee la absorbancia a $\lambda = 562 \text{ nm}$. Las medidas se deben hacer rápidamente porque las muestras cambian de color con el tiempo. En la Figura III.31 se representa la recta de calibrado obtenida, la cual se utiliza para obtener la concentración total de proteínas de las muestras.

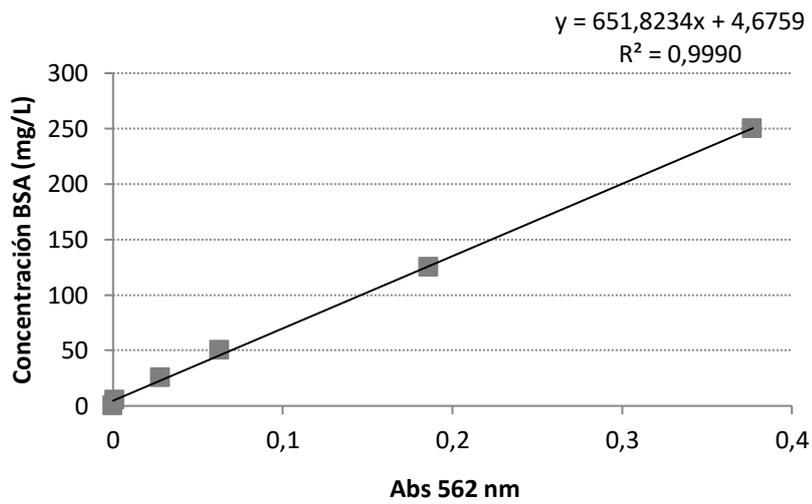


Figura III.31: Recta de calibrado del Método BCA

Material y Métodos

4.4.2. Método Micro BCA

Este método se emplea para determinar bajas concentraciones de proteínas, comprendidas entre 0,5 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El ensayo se basa en la reducción de los iones Cu^{2+} por la proteína (igual que el método BCA). De este modo, el Cu^+ formado se detecta por conversión a una sustancia de color violeta por reacción con el bicinconinato. A 562 nm la absorbancia del complejo $\text{Cu(I)-(bicinconinato)}_2$ es proporcional a la concentración de proteína.

El método tiene pocas interferencias y es insensible a detergentes como el Triton X-100.

Material y reactivos:

- Micropipeta de 10 a 100 μL y micropipeta de 100 a 1000 μL
- Eppendorfs de 2 mL y porta eppendorfs
- Agitador vórtex
- Base agitadora magnética e imán
- Baño termostático a 60° C
- H_2O ultrapura
- Disolución tampón Tris-HCl 10mmol/L
- Albúmina de suero bovino estándar (BSA) 2 mg/mL
- Kit Micro BCA de AppliChem, con los reactivos A, B y C:
 - A: Tartrato en tampón carbonato alcalino
 - B: 4% Ácido bicinconínico en H_2O
 - C: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en H_2O
- Espectrofotómetro Hach-Lange DR 5000 y cubetas

Procedimiento:

1. Se enumeran los eppendorfs.
2. Se enciende el espectrofotómetro 15 ó 20 minutos antes de empezar a trabajar con él para que se caliente la lámpara.
3. Se prepara la disolución "Working Reagent": se mezclan 25 mL de A, 24 mL de B y 1 mL de C y se agita.
4. Se pipetea 1 mL de cada estándar para la recta de calibrado o muestra en el eppendorf.
5. Se adiciona 1 mL de disolución "Working Reagent".
6. Se agita en el vórtex.
7. Se introduce en el baño a 60°C durante 1h.
8. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente.
9. Se mide la absorbancia a $\lambda = 562 \text{ nm}$. Las medidas se deben hacer rápidamente porque las muestras cambian de color con el tiempo. En la Figura III.32 se representa la recta de calibrado obtenida, la cual se utiliza para obtener la concentración total de proteínas de las muestras.

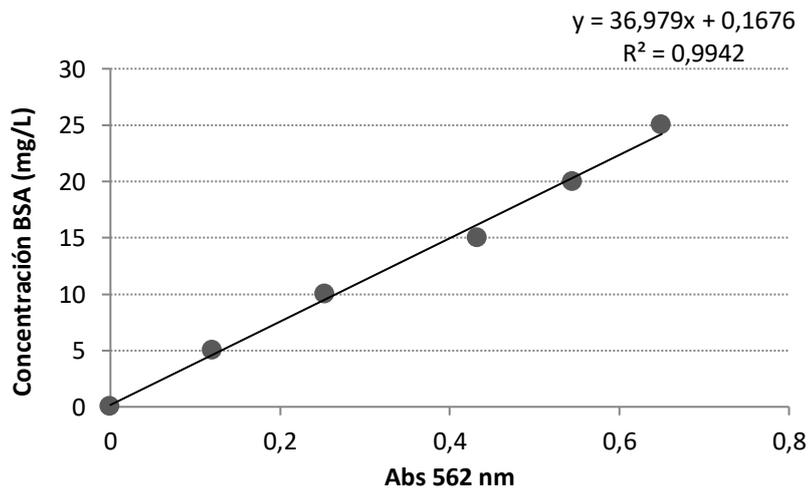


Figura III.32: Recta de calibrado del Método Micro BCA

4.4.3. Método Lowry modificado

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico para la valoración cuantitativa de las proteínas [28]. Consiste en añadir a la muestra un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$.

Este método consta de dos etapas:

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

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

Material y reactivos:

- Micropipetas de 100 a 1000 μL y de 1000 a 5000 μL
- Vasos de 25 mL y cubetas de kits de 10mL
- Agitador vórtex
- Base agitadora magnética e imán
- H_2O ultrapura
- Disolución tampón Tris-HCl 10mmol/L
- Albúmina de suero bovino estándar (BSA) 2 mg/mL

- Espectrofotómetro Hach-Lange DR 5000 y cubetas
- 100 mL NaOH 0.1 N
- Reactivo A: 2g Na_2CO_3 + 0,027g tartrato de NaK ($4\text{H}_2\text{O}$) + 100 ml NaOH (0,1N)
- Reactivo B: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1 gota H_2SO_4 conc. + 10 ml H_2O ultrapura
- Reactivo C: 50 ml reactivo A+ 1 ml reactivo B
- Reactivo D: Disolución acuosa de Folin con dilución 1:2

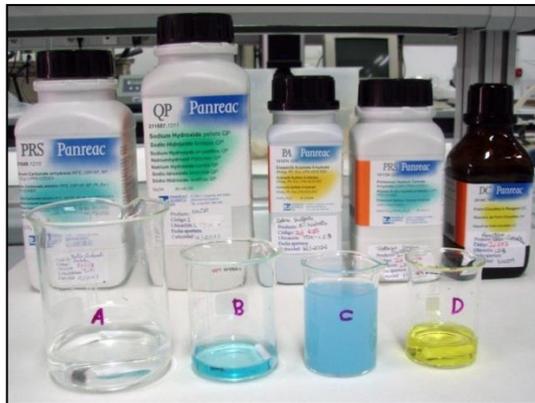


Figura III.33: Reactivos y disoluciones preparadas

Procedimiento:

1. Enumerar las cubetas.
2. Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de empezar a trabajar con él para que se caliente la lámpara.
3. Preparar la recta de calibrado con una disolución de BSA estándar con rango de concentraciones entre 0-200 mg/L.
4. Mezclar 1 mL de dilución de la recta de calibrado o muestra con 3 mL reactivo C en la cubeta.
5. Agitar en el vórtex
6. Dejar reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Material y Métodos

7. Añadir 0.3 ml de reactivo D a cada cubeta.
8. Agitar en el vórtex.
9. Dejar reaccionar 30 minutos.
10. Medir la absorbancia a $\lambda = 750 \text{ nm}$ haciendo previamente el blanco. En la Figura III.34 se muestra el aspecto de las cubetas con la disolución y en la Figura III.35 se representa la recta de calibrado obtenida, la cual se utiliza para obtener la concentración de proteínas de las muestras.

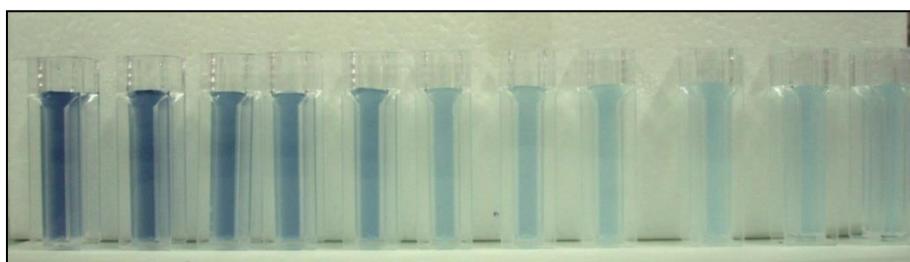


Figura III.34: Cubetas con la disolución de la recta de calibrado con el método Lowry

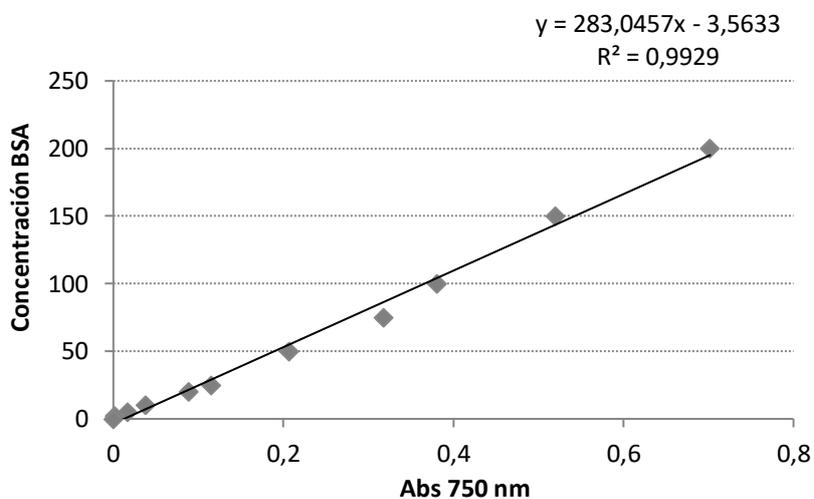


Figura III.35: Recta de calibrado del Método Lowry

4.5. ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

4.5.1. Método Dubois

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

Azúcar simple $\xrightarrow{\text{Azúcar simple} + \text{Fenol} + \text{Ácido sulfúrico}}$ color amarillo-naranja

La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes. Esta absorbancia puede ser medida a 490 nm y la concentración total de carbohidratos de las muestras problema puede ser medida con respecto a una curva de calibrado estándar preparada [29].

Material y reactivos:

- Micropipetas de 100 a 1000 μL y de 1000 a 5000 μL
- Vasos de 25 mL y cubetas de kits de 10mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Agitador vórtex
- Base agitadora magnética e imán
- Campana extractora
- H₂O ultrapura
- Disolución tampón Tris-HCl 10mmol/L
- Espectrofotómetro Hach-Lange DR 5000 y cubetas
- Fenol PA 134852.1209, 5% peso
- Ácido sulfúrico concentrado 96 %

Material y Métodos

- D-Glucosa monohidrato PRS 143140.1210

Procedimiento:

1. Enumeran las cubetas.
2. Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de empezar a trabajar con él para que se caliente la lámpara.
3. Preparar la recta de calibrado con una disolución de D-Glucosa monohidrato con rango de concentraciones entre 0-200 mg/L.
4. Tomar 1 mL de cada dilución preparada para la recta de calibrado y/o de la muestra a analizar y añadir 1 mL de la disolución del fenol. Realizar en campana. Las disoluciones más concentradas adquieren un color anaranjado mientras que las más diluidas amarillento.
5. Añadir 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y agitar en el vórtex.
6. Dejar reaccionar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y volver a agitar en el vórtex.
7. Dejar reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Medir la absorbancia a $\lambda = 490 \text{ nm}$ haciendo previamente el blanco. En la Figura III.36 se muestra el aspecto de las cubetas con la disolución y en la Figura III.37 se representa la recta de calibrado obtenida.

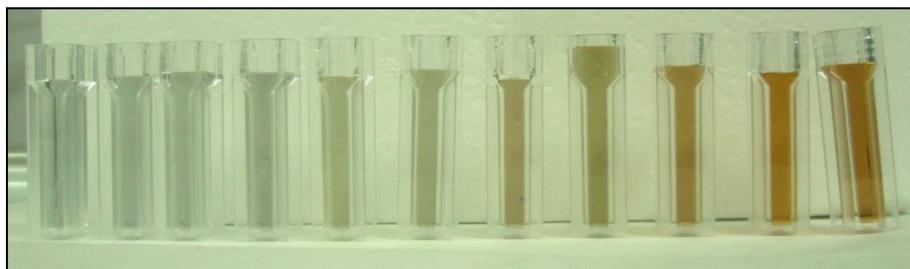


Figura III.36: Cubetas con la disolución de la recta de calibrado con el método Dubois

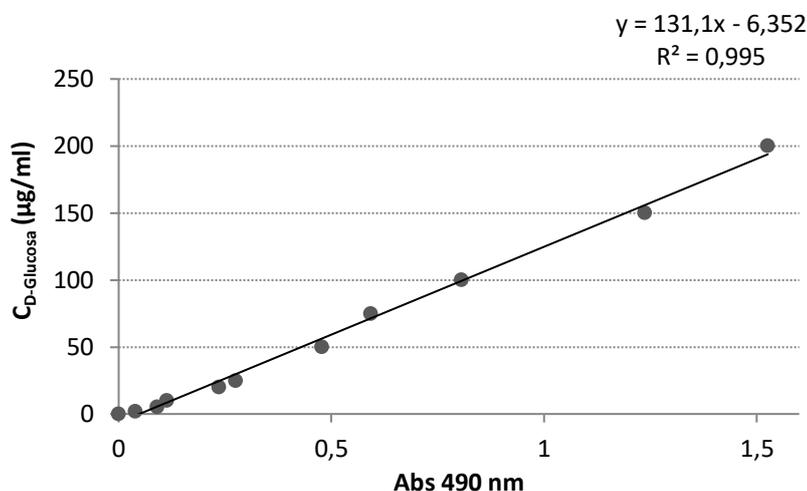


Figura III.37: Recta de calibrado del Método Dubois

4.5.2. Método Antrona

La antrona en ácido sulfúrico concentrado reacciona para formar un derivado del furano de color verde con un máximo de absorción en 625nm. La reacción colorimétrica cumple con la Ley de Beer y Lambert en el rango de concentración estudiado, entre 10 y 100 mg/L de Glucosa.

La sensibilidad del método es de 3 mg/L de Glucosa. La desviación estándar en el rango estudiado es de 4 mg/L.

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

Material y reactivos:

- Micropipetas de 100 a 1000 µL y de 1000 a 5000 µL
- Vasos de 25 mL y cubetas de kits de 10mL

Material y Métodos

- Matraz aforado de 100 mL
- Agitador vórtex
- Base agitadora magnética e imán
- Baño termostático a 100° C
- Cristalizador con hielo
- Campana extractora
- H₂O ultrapura
- Disolución tampón Tris-HCl 10mmol/L
- Espectrofotómetro Hach-Lange DR 5000 y cubetas
- Ácido sulfúrico concentrado 96 %
- D-Glucosa monohidrato PRS 143140.1210
- Antrona 1.01468.0010 de Merck

Procedimiento:

1. Enumeran las cubetas.
2. Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes para que se caliente la lámpara.
3. Preparar una disolución de antrona 0.2% en H₂SO₄.
4. Preparar la recta de calibrado con una disolución de D-Glucosa monohidrato con rango de concentraciones entre 0-100 mg/L.
5. Tomar 1 mL de cada dilución preparada para la recta de calibrado y/o de la muestra a analizar y añadir 2 mL de la disolución de antrona en ácido sulfúrico, en las cubetas-kits.
6. Agitar en el vórtex durante 10 seg.
7. Dejar reaccionar 14 minutos en el baño a 100°C (Figura III.38).
8. Enfriar durante 5 minutos en una cubeta con hielo (Figura III.38).
9. Medir la absorbancia a $\lambda = 625 \text{ nm}$. En la Figura III.39 se muestra el aspecto de las cubetas con la disolución y en la Figura III.40 se

representa la recta de calibrado obtenida, la cual se utiliza para obtener la concentración total de carbohidratos de las muestras.



Figura III.38: Baño a 100° C y baño con hielo

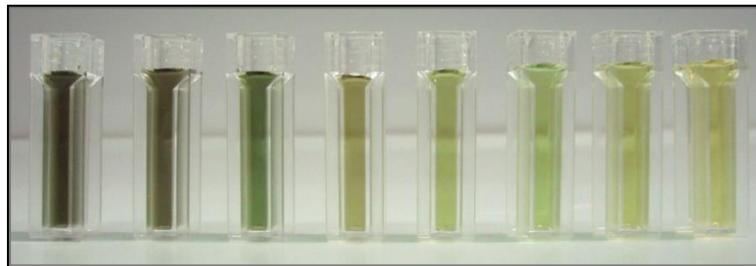


Figura III.39: Cubetas con la disolución de la recta de calibrado con el método Antrona

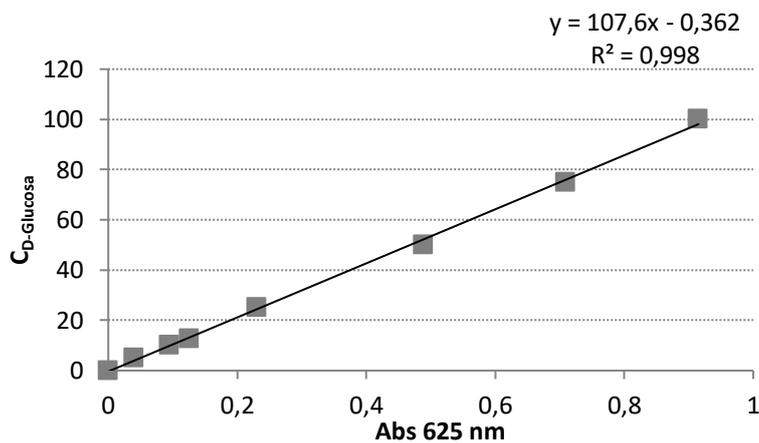


Figura III.40: Recta de calibrado del Método Antrona

4.6. ANÁLISIS DE ADN

El ADN se mide para comprobar si la extracción realizada ha sido demasiado agresiva y así poder seleccionar el método de extracción que menor lisis celular cause.

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

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

Material:

- Micropipetas y puntas de 0,50 a 10 µL, de 10 a 50 µL y de 100 a 1000 µL.
- Tubos eppendorf de 500 µL para ensayos Qubit™.
- Eppendorfs de 2 mL.
- Kit de determinación de ADN HS (alta sensibilidad) de rango 0,2-100 ng Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen.
- Kit de determinación de ADN BR (amplio rango) de rango 2-1000 ng Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit de Invitrogen.
- Fluorómetro Qubit™ de Invitrogen, el cual se muestra en la Figura III.41.



Figura III.41: Fluorómetro utilizado para la determinación del ADN

Procedimiento:

En función de la concentración de ADN que se espera encontrar en la muestra se utiliza un kit u otro, por ejemplo, las muestras de SMP como no han sido sometidas a ningún proceso de extracción se analizan con el rango más sensible, el HS. El procedimiento a seguir es el mismo independientemente del kit seleccionado.

1. Se enumeran los tubos de PCR.
2. Se preparan las dos muestras de estándar (ADN prediluido) que se suministran en el kit para realizar el calibrado del equipo. El primer estándar tiene una concentración de 0 ng/ μ L y el segundo de 100ng/ μ L. Se toman 10 μ L de cada uno y se coloca cada uno en un tubo de PCR.
3. Se introducen 10 μ L de cada muestra en los microtubos de 500 μ L.
4. Se prepara el “Quant-iT reagent solution” que es el reactivo que se añade a cada muestra y hace que se desarrolle el color que indica la presencia de ADN. Se prepara juntando 10 μ L de fluorocromo con 1990 μ L del tampón suministrado. Sólo emite fluorescencia cuanto se une a la molécula objetivo.
5. Se añade a cada muestra 190 μ L del “Quant-iT reagent solution” preparado anteriormente.
6. Se agitan los tubos en el vórtex.

7. Se incuba durante 2 minutos.
8. Se mide el valor de ADN en el fluorómetro.

Nota: Como el fluorocromo es sensible a la luz, se debe trabajar con la máxima oscuridad posible.

4.7. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO DE ALTA RESOLUCIÓN (HPSEC)

Para el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (cromatografía líquida) se utilizó un cromatógrafo Shimadzu LC-10AD equipado con una columna Phenomenex Biosep™ Sec-S y posterior detección a UV 254 nm.

Con la cromatografía HPSEC, las moléculas grandes son eluidas de la columna en primer lugar y las moléculas más pequeñas después.

4.8. ESPECTROFOTÓMETRO DE FLUORESCENCIA (FSEEM)

El espectro de excitación-emisión se ha medido utilizando el espectrofotómetro de fluorescencia Agilent Cary Eclipse.

Para construir la matriz de excitación-emisión se ha medido la excitación de 220 a 525 nm. La emisión se ha medido de 280 a 560 nm, realizando incrementos de 5 nm.

Una vez fijados los parámetros de medida se realiza un blanco con agua ultrapura y a continuación se introduce la muestra (diluida 5 veces con agua ultrapura) en la cubeta y se pulsa *Start* para realizar la medida. Tanto la luz directa que atraviesa el cristal de la celda como la emitida por la muestra, es recogida por el sistema de detección [30].

Una vez terminada la medida los datos se almacenan en formato *csv* que posteriormente son procesados con el programa ORIGIN.

5. ANÁLISIS DEL AGUA RESIDUAL

Para las EDAR industriales, adicionalmente se ha caracterizado el agua residual de entrada en cada depuradora y se han medido los siguientes parámetros: pH, conductividad, nitrógeno total (NT), nitrógeno total soluble (NTs), nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$), demanda química de oxígeno (DQO), DQO soluble (DQOs) y sólidos suspendidos totales y volátiles.

El pH y la conductividad se midieron respectivamente con el pH-metro (GLP-21+) y el EC-metro (GLP-31+) de CRISON (España).

NT, NTs, $N-NH_4^+$, DQO y DQOs se determinaron espectrofotométricamente mediante ensayos con kits estándar de Merck. Las muestras tuvieron que ser diluidas para que no se produjeran interferencias por la salinidad y el color que presentaban las muestras.

Los sólidos suspendidos se midieron por duplicado de acuerdo con APHA (2005), descrito anteriormente en el punto 3.1.

6. RESPIROMETRÍA DEL FANGO ACTIVO

Los ensayos de respirometría se realizaron en un respirómetro modelo BM-Advance de SURCIS (España), mostrado en la Figura III.42. La respirometría se basa en el consumo de oxígeno de los microorganismos a partir del fango activo. Este ensayo se realizó a las muestras de licor de mezcla de procedencia industrial. Para cada ensayo, se llenó el depósito del reactor con 1 L de fango activo procedente de los biorreactores MBR-LS o MBR-HS, dependiendo del experimento que se llevara a cabo. El fango activo fue previamente aireado durante 24 h para obtener condiciones endógenas en la biomasa. Se realizó un experimento dinámico con agitación continua, aireación y recirculación entre ambos lados del depósito por medio de una bomba peristáltica, el oxígeno disuelto se monitorizó en continuo. La temperatura se mantuvo constante a 22°C durante el experimento a través de un módulo refrigerador Peltier.



Figura III.42: Respirómetro SURCIS BM-Advance

El coeficiente de rendimiento de la biomasa heterótrofa (Y_H) se calculó mediante la (Ec. III.20).

$$Y_H = 1 - \frac{OC}{DQO_{\text{acetato de sodio}}} \quad (\text{Ec. III.20})$$

Donde OC es el oxígeno consumido por los microorganismos para biodegradar un sustrato. Para determinar el OC se realizó una prueba de respirometría dinámica mediante la adición de una solución de acetato de sodio de 400 mg/L (DQO = 300 mg/L). Con el fin de determinar el fraccionamiento de la DQO y ver la biodegradación del agua residual a estudio, se realizaron diferentes ensayos dinámicos bien añadiendo en el depósito 15 mL de agua residual influente (para la DQO total), o bien agua residual influente filtrada por 0,45 μm (para calcular la fracción soluble, que representa la DQO rápidamente biodegradable).

7. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DEL LICOR DE MEZCLA

7.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DEL FANGO ACTIVO

Los tratamientos de depuración de aguas residuales mediante fangos activos implican un cultivo de biomasa capaz de degradar la materia orgánica presente en el agua residual. Las características de esta población de microorganismos dependen de las condiciones medioambientales y de las condiciones de operación de la planta de tratamiento.

Para evaluar el tipo de microorganismos presentes, así como las características de los flóculos del fango activo, es necesario controlar la biomasa ópticamente. Para ello, se ha utilizado el microscopio BK1000 de la marca COIC. Se trata de un microscopio binocular con revólver cuádruple (10x, 40x, 100x y 400x), equipado con cámara para realizar fotografías desde el ordenador.

Las muestras de licor de mezcla del MBR se observaron al microscopio el mismo día que la muestra fue recibida para evitar el deterioro de la biomasa.

El procedimiento consiste en homogeneizar la muestra, tomar 25 μL con una micropipeta y depositar sobre un portaobjetos, colocando un “cubre” sobre la muestra. A continuación, se coloca el portaobjetos en el microscopio y se examinan las características morfológicas del flóculo y la tipología de microorganismos presentes en el licor de mezcla. Con el fin de evaluar la totalidad de la muestra, se realiza un barrido de la muestra de izquierda a derecha y de arriba abajo.

7.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es la luminosidad de una sustancia, causada por exposición a radiación. En este proceso, la sustancia irradiada absorbe radiación de una fuente específica y muy rápidamente emite luz cuya

Material y Métodos

energía es menor (de mayor longitud de onda) que la de la radiación que ha absorbido [31].

En la Figura III.43 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de un microscopio de fluorescencia, poniendo como ejemplo una tinción de una muestra realizada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), el cual se excita en azul y emite en verde-amarillento.

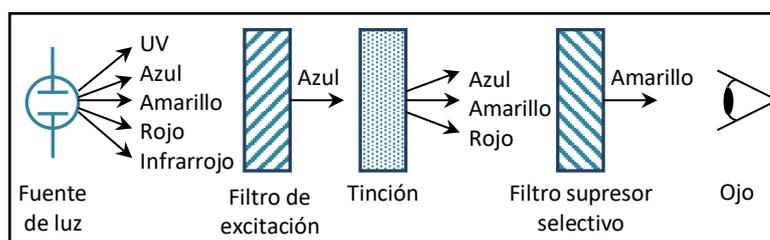


Figura III.43: Esquema del funcionamiento del microscopio de fluorescencia. Ejemplo de tinción realizada con el fluorocromo FITC

Para la excitación de la fluorescencia de un fluorocromo, es necesaria una fuente de luz que emita suficiente radiación a la longitud de onda necesaria. Mediante el filtro de excitación se selecciona el espectro que se utilizará para excitar la muestra. La muestra teñida emite fluorescencia en un espectro distinto al de excitación y refleja parte del espectro utilizado para la excitación. Finalmente, el filtro supresor selectivo se encarga de eliminar la parte del espectro reflejado y permite visualizar el espectro de emisión de interés, el correspondiente al fluorocromo.

Para la caracterización microbiológica de las EPS contenidas en el licor de mezcla del MBR y para el análisis de la viabilidad celular, se ha utilizado el microscopio Olympus BX50F con una lámpara de mercurio de alta presión 100-W, la cual proporciona una excitación en el rango del ultravioleta y en las regiones azul y verde (Figura III.44). Se ha utilizado un objetivo de 40 aumentos. Las fotografías se realizaron con una cámara digital integrada al microscopio modelo Olympus DP10.



Figura III.44: Microscopio OLYMPUS BX50F utilizado en los ensayos con lámpara de mercurio de alta presión 100-W

Cuando se realiza una tinción se añade un fluorocromo a la muestra. Un fluorocromo es una molécula capaz de absorber fotones y emitir fotones de menor energía (mayor longitud de onda). Debido a la configuración electrónica de cada fluorocromo, cada uno de ellos presenta un espectro de excitación y emisión característico y único.

Para excitar la fluorescencia de un fluorocromo se necesita una fuente de luz intensa que proporcione la longitud de onda de excitación del fluorocromo.

En la Tabla III.6 se muestran los distintos fluorocromos utilizados para la tinción de proteínas, carbohidratos y ADN, así como también la longitud de onda de excitación-emisión de los mismos.

Material y Métodos

Tabla III.6: Fluorocromos utilizados en las tinciones

Fluorocromo	Tinción	$\lambda_{\text{excitación-emisión}}$ (nm)
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Proteínas	490/510
NanoOrange	Proteínas	470/570
Concanavalina A isotiocianato de tetrametilrodamina (Tritc-Con A)	Carbohidratos	555/580
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride(DAPI)	Ácidos nucleicos (ADN)	350/470
SYTO 9	Ácidos nucleicos (ADN)	482/500

En la presente tesis se han seguido dos protocolos para realizar las tinciones de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), el descrito por Nosyk et al. (2008) [32] y el descrito por Sun et al. (2008) [33]. Los Fluorocromos utilizados en cada protocolo se resumen a continuación en la Tabla III.7:

Tabla III.7: Fluorocromos utilizados para teñir las EPS según Nosyk y Sun

Método	Proteínas	Carbohidratos	ADN
NOSYK	FITC	TRITC-Con A	DAPI
SUN	NanoOrange	TRITC-Con A	SYTO 9

7.2.1. Fijación de la muestra

La fijación de la muestra se realiza para poder preservar y fijar los microorganismos en el microscopio. Se ha realizado una fijación química mediante la cual se protegen las subestructuras celulares finas y la morfología de los microorganismos más grandes. El fijador penetra en la célula y reacciona principalmente con las proteínas y lípidos, inactivándolos e inmovilizándolos. Se ha utilizado como fijador formaldehído al 3.7%.

El procedimiento seguido para fijar las muestras es el siguiente [32]:

- Limpiar los portaobjetos en primer lugar con agua destilada y a continuación con agua Milli-Q y secarlos.
- Añadir 1 mL de fango activo en un eppendorf y centrifugar a 6000 rpm durante 8 min.
- Desechar el sobrenadante y resuspender en el volumen inicial con agua estéril (agua Milli-Q). Repetir este paso tres veces.
- Tomar 10 μ L del fango lavado e inmovilizarlo en el portaobjetos bajo condiciones de esterilidad durante 1 h a temperatura ambiente.
- Fijar la muestra con 50 μ L de solución de formaldehído 3.7% durante 1 h a temperatura ambiente.
- Una vez fijada la muestra, lavar el portaobjetos con agua destilada y Milli-Q 3 veces y dejar secar durante 30 minutos bajo condiciones de esterilidad a temperatura ambiente.

En la Figura III.45 se muestra a modo de ejemplo las muestras preparadas en los portas para ser teñidas.

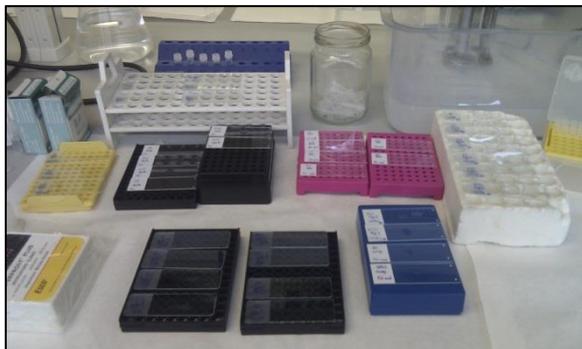


Figura III.45: Muestras fijadas en la muestra 1

Una vez fijada la muestra, el siguiente paso será proceder a la tinción de la misma. Mediante la adición de fluorocromos específicos a la muestra se determinarán las proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. En los siguientes apartados se detalla el procedimiento llevado a cabo según el método de Nosyk y de Sun para cada una de estas sustancias.

7.2.2. Tinción de proteínas

Método de NOSYK [32]

La tinción se realiza con el isómero I del isotiocianato de fluoresceína (FITC, de Sigma-Aldrich).

- Diluir el FITC con acetona para preparar una solución “stock” de 10 g/L.
- Preparar la solución de trabajo en el momento de realizar la tinción, diluyendo la solución “stock” 1:25 con tampón PBS (Thermo Scientific).
- Añadir 30 μ L de la solución de trabajo al porta previamente fijado y dejar incubar durante 60 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Lavar el porta con agua destilada y agua Milli-Q 3 veces y dejar secar.

Método de SUN [33]

La tinción se realiza con el kit de cuantificación de proteínas NanoOrange® (Molecular Probes, Invitrogen).

- Preparar una dilución 1:10 del fluorocromo NanoOrange® con tampón del kit de Invitrogen.
- Añadir 30 µL al porta previamente fijado y dejar incubar durante 15 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Lavar el porta con agua destilada y agua Milli-Q 3 veces y dejar secar.

7.2.3. Tinción de carbohidratos

Ambas tinciones se realizan con el mismo fluorocromo pero utilizan diferentes concentraciones del mismo.

Método de NOSYK [32]

La tinción se realiza con concanavalina A isotiocianato de tetrametilrodamina (Molecular Probes, Invitrogen).

- Preparar la solución “stock” diluyendo el TRITC-Con A a 1 g/L con una solución estéril 0.1 M de bicarbonato sódico (pH 8.3).
- Preparar la solución de trabajo de 0.1 g/L en el momento de realizar la tinción, diluyendo la solución “stock” 1:10 con agua Milli-Q.
- Añadir 50 µL de la solución de trabajo de 0.1 g/L al porta fijado y dejar incubar durante 20 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Lavar el porta con agua destilada y agua Milli-Q 3 veces y dejar secar.

Material y Métodos

Método de SUN [33]

La tinción se realiza con concanavalina A isotiocianato de tetrametilrodamina (Molecular Probes, Invitrogen).

- Preparar la solución "stock" diluyendo el TRITC-Con A a 1 g/L con una solución estéril 0.1 M de bicarbonato sódico (pH 8.3).
- Preparar la solución de trabajo de 0.25 g/L en el momento de realizar la tinción, diluyendo la solución "stock" 1:4 con agua Milli-Q.
- Añadir 50 µL de la solución de trabajo de 0.25 g/L al porta fijado y dejar incubar durante 20 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Lavar el porta con agua destilada y agua Milli-Q 3 veces y dejar secar.

7.2.4. Tinción de ácidos nucleicos

Método de NOSYK [32]

La tinción se realiza con el fluorocromo 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) de Molecular Probes (Invitrogen). Es un fluorocromo semi-permeable que se une selectivamente al ADN, emitiendo una fluorescencia azul.

- Preparar la solución "stock" de 2 mg/mL, utilizando metanol para diluir el DAPI.
- Preparar la solución de trabajo de 1 mg/L en el momento de realizar la tinción, diluyendo la solución "stock" con tampón PBS.
- Añadir 30 µL de la solución de trabajo al porta fijado y dejar incubar durante 40 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

- Lavar el porta con agua destilada y agua Milli-Q 3 veces y dejar secar.

Método de SUN [33]

La tinción se realiza con SYTO 9 de Molecular Probes (Invitrogen). El SYTO9 es capaz de penetrar en todas las células, es decir se tiñe el ADN extracelular y el intracelular, emitiendo una fluorescencia verde.

- Diluir el SYTO9 a una concentración 25 μM , con agua MilliQ.
- Añadir 30 μL de la disolución preparada al porta fijado y dejar incubar durante 15 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Lavar el porta con agua destilada y agua Milli-Q 3 veces y dejar secar.

En la Figura III.46 se muestran dos portaobjetos con la muestra de licor de mezcla fijada y posteriormente teñida.



Figura III.46: Portaobjetos con las muestras fijadas y teñidas

7.2.5. Tratamiento y evaluación de las imágenes tomadas al microscopio de epifluorescencia

Una vez los portaobjetos han sido teñidos con el protocolo descrito anteriormente, bien el de NOSYK o bien con el de SUN, se añaden 10 μL del

Material y Métodos

reactivo de montaje Vectashield® en el porta y se coloca un cubre de 18x18 mm. Este reactivo se adiciona para preservar la fluorescencia.

A continuación, se deben realizar un mínimo de 20 fotografías por cada fluorocromo, con el microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo de 40 aumentos (Figura III.44). Para ello, se debe ir cambiando el filtro de excitación. Es decir, se utiliza un filtro para las proteínas, otro para los carbohidratos y otro para el ADN. En total, por cada muestra fijada y teñida en el portaobjetos se deben realizar un mínimo de 60 fotografías. En total, para el desarrollo de esta tesis se tomaron 3000 fotografías.

Una vez tomadas las imágenes se elimina la fluorescencia de fondo utilizando el software Adobe® Photoshop® CC v14, así como también se superponen las 3 imágenes tomadas para tener la composición total.

Finalmente, las imágenes se analizan con una rutina programada con la herramienta "Image Software Toolbox™" del software Matlab v 2009b. Esta herramienta proporciona un conjunto de algoritmos de referencia para el análisis de imágenes. El procedimiento consiste en descomponer las imágenes en escala de grises, es decir las imágenes verdes, rojas o azules se pasan a imágenes en escala de grises, de modo que se facilita el conteo de los píxeles. La rutina de cuantificación ha sido desarrollado por Borrás (2008) en su Tesis Doctoral [34]. El programa tiene dos parámetros que se varían en función de la imagen a procesar, *Low_in* y *Gamma_in*, el primero de ellos sirve para eliminar la señal de fondo y el segundo relaciona la intensidad de la luz de la imagen original y la nueva imagen.

Los resultados se expresan como el valor medio de células y la incertidumbre, calculada como la desviación estándar dividida por la raíz cuadrada del número de muestras.

En la Figura III.47 se muestra un ejemplo de las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia. En el lado izquierdo, las imágenes tomadas con los diferentes filtros: verde (proteínas), rojo (carbohidratos) y azul (ADN), así como la superposición de las tres imágenes. En el lado derecho, se pueden observar las imágenes procesadas con Matlab.

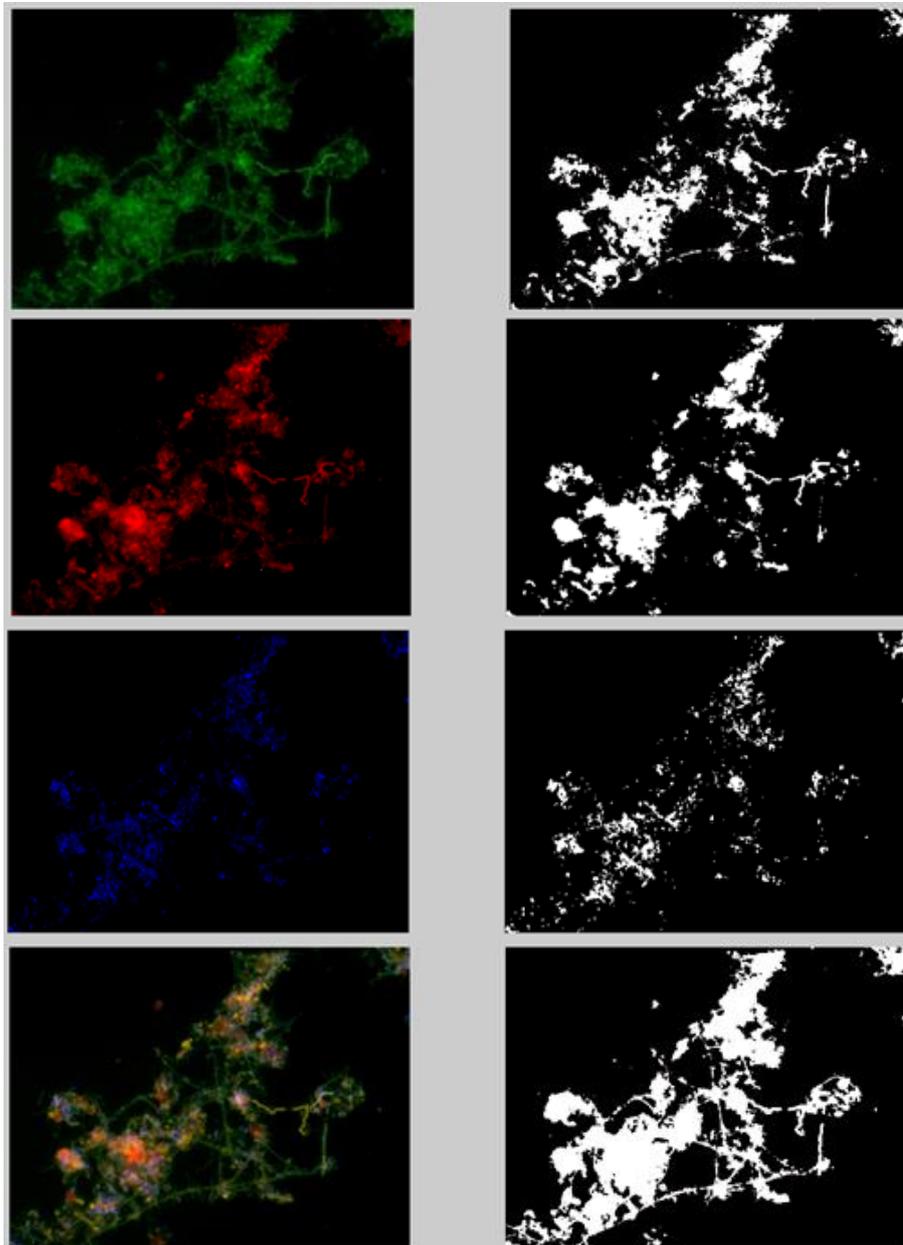


Figura III.47: Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia tomadas con diferentes filtros: verde, rojo y azul y superposición de imágenes (izquierda). Imágenes procesadas con Image Software Toolbox de Matlab (derecha.)

7.3. VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular es una técnica que se utiliza para evaluar la viabilidad de la población bacteriana en función de la integridad de la membrana celular. Las células que tengan la membrana dañada se tiñen de rojo (se consideran células muertas), mientras que las que tienen la membrana íntegra (células viables) se tiñen de verde.

Para ello se utiliza el kit *LIVE/DEAD BacLight™* de Molecular Probes. El kit contiene dos fluorocromos que tiñen el ADN, por un lado el SYTO 9 que es una molécula pequeña la cual penetra en la membrana plasmática intacta y, por otro, el Ioduro de Propidio que es una molécula de mayor tamaño la cual penetra sólo en las células dañadas y cuya fluorescencia es una longitud de onda mayor que la del SYTO 9. Las células viables se tiñen de verde, mientras que las dañadas se tiñen de rojo.

El procedimiento a seguir [35] se resume en la Figura III.48:

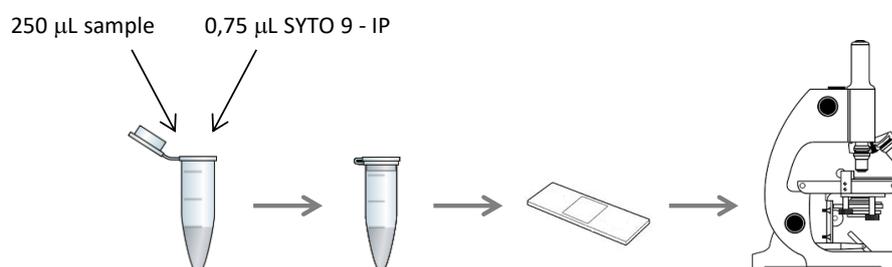


Figura III.48: Método de viabilidad celular con SYTO9 y Ioduro de Propidio

- Preparar una dilución del fango 1:4 con tampón fosfato salino PBS.
- Tomar 250 µL de muestra y poner en un eppendorf.
- Adicionar y agitar con vórtex 0.75 µL de mezcla de los fluorocromos SYTO9 y ioduro de propidio.
- Incubar en agitación durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

- Lavar el portaobjetos con agua destilada.
- Poner 10 μ L del reactivo de montaje Vectashield[®] en el porta y tapar con un cubre de 18x18. Este reactivo se adiciona para preservar la fluorescencia.
- Realizar 20 fotografías mínimo en el microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo 40/0.65.
- Procesar las imágenes con el software Biomagel™v2.1 [36], mostrado en la Figura III.49.

En total, para el desarrollo de esta tesis se tomaron 500 fotografías. Con la ayuda de este software es posible distinguir y calcular el porcentaje de células viables y no viables, es decir, las que emiten una fluorescencia verde de las que la emiten roja. Los resultados se expresan como la superficie (μ m) teñida en cada imagen y el porcentaje que representa frente al total.

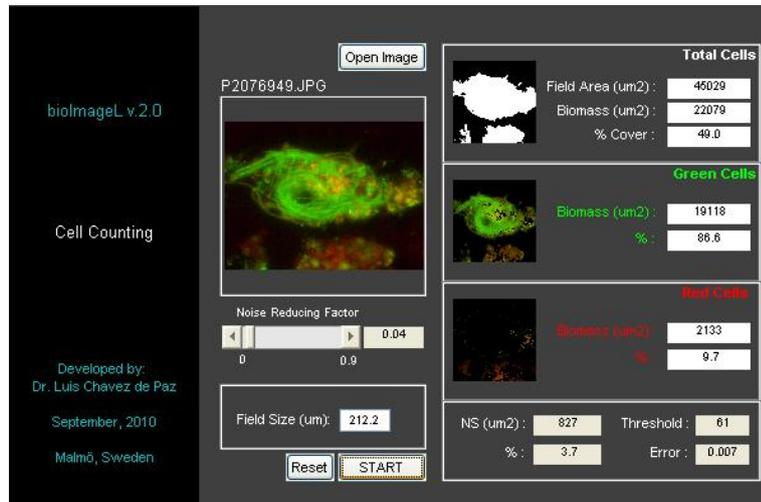


Figura III.49: Imagen de viabilidad celular procesada con el programa Biomagel™

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se han utilizado dos programas, el Statgraphics Centurion XVI.II y el SIMCA de Umetrics. El primero de ellos se ha utilizado para estudiar la existencia o no de correlaciones y el segundo para realizar un análisis multivariado mediante una regresión de mínimos cuadrados parciales (o *partial least square*, PLS).

En primer lugar, se ha calculado el coeficiente de correlación de Pearson, el cual determina si existe relación alguna entre las variables a estudiar. Este valor se encuentra entre -1 y +1 e indica la fuerza de la relación lineal entre dos variables. El p-valor indica el grado de significación del coeficiente de correlación correspondiente. Si el p-valor es menor a 0.05 el coeficiente es significativo.

Además, se ha llevado a cabo un análisis de la varianza, ANOVA, y se ha aplicado el método de la mínima diferencia significativa para determinar el intervalo LSD de Fisher (*Least significant difference*), el cual forma un intervalo de confianza para cada par de medias con un nivel de confianza del 95%.

La regresión de mínimos cuadrados parciales o PLS es un método estadístico que obtiene una regresión lineal mediante la proyección de las variables de predicción y las variables observadas en un nuevo espacio. De este modo se consigue obtener relaciones entre dos grupos de variables, las variables independientes (representadas en la matriz X) y las variables dependientes (representadas en la matriz Y), obteniendo una variable latente que modela la covarianza.

La regresión PLS es un método relacionado con el análisis de componentes principales y la regresión múltiple. En primer lugar extrae un conjunto de variables latentes que explican la covarianza entre las variables independientes y dependientes. A continuación, se predicen los valores de las variables dependientes mediante la descomposición de las variables independientes.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Y. Li, S.Y. Park, J. Zhu, Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15 (2011) 821–826.
- [2] F.M. White, *Mecánica de Fluidos*, 6th ed., Mc Graw Hill, 2008.
- [3] G. Laera, C. Giordano, a. Pollice, D. Saturno, G. Mininni, Membrane bioreactor sludge rheology at different solid retention times, *Water Res.* 41 (2007) 4197–4203.
- [4] F. Yang, A. Bick, S. Shandalov, A. Brenner, G. Oron, Yield stress and rheological characteristics of activated sludge in an airlift membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 334 (2009) 83–90.
- [5] N. Eshtiaghi, F. Markis, S.D. Yap, J.C. Baudez, P. Slatter, Rheological characterisation of municipal sludge: A review, *Water Res.* 47 (2013) 5493–5510.
- [6] S.I. Patsios, T.B. Goudoulas, E.G. Kastrinakis, S.G. Nychas, a. J. Karabelas, A novel method for rheological characterization of biofouling layers developing in membrane Bioreactors (MBR), *J. Memb. Sci.* 482 (2015) 13–24.
- [7] C.W. Macosko, *Rheology: principles, measurements and applications*, Wiley-VCH, 1994.
- [8] D. Claeßens, H. Faouzi, D. Mayer, *Numerische Simulation einer Taylor-Couette Strömung und Modellierung thrombozytärer Reaktionen*, 2009.
- [9] N. Ratkovich, W. Horn, F.P. Helmus, S. Rosenberger, W. Naessens, I. Nopens, T.R. Bentzen, Activated sludge rheology: A critical review on data collection and modelling, *Water Res.* 47 (2013) 463–482.
- [10] A. Pollice, C. Giordano, G. Laera, D. Saturno, G. Mininni, Physical characteristics of the sludge in a complete retention membrane bioreactor, *Water Res.* 41 (2007) 1832–1840.
- [11] Z. Wu, Z. Wang, Z. Zhou, G. Yu, G. Gu, Sludge rheological and physiological characteristics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor, *Desalination.* 212 (2007) 152–164.
- [12] G.W. Chen, W.W. Lin, D.J. Lee, Capillary suction time (CST) as a measure of

Material y Métodos

- sludge dewaterability, *Water Sci. Technol.* 34 (1996) 443–448.
- [13] APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed., American Public Health Association, Washington DC, 2005.
- [14] Malvern, Zetasizer Nano Series. User manual, Malvern Instruments, n.d.
- [15] L. Mikkelsen, Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering, *Water Res.* 36 (2002) 2451–2462.
- [16] Malvern Instruments Ltd, Mastersizer 2000 User Manual, (2007).
- [17] T.-H. Bae, T.-M. Tak, Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor, *J. Memb. Sci.* 264 (2005) 151–160.
- [18] M. Ras, E. Girbal-Neuhauser, E. Paul, M. Spérandio, D. Lefebvre, Protein extraction from activated sludge: an analytical approach., *Water Res.* 42 (2008) 1867–78.
- [19] J. Wingender, T.R. Neu, H.-C. Flemming, *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*, Springer-Verlag, 1999.
- [20] B. Frølund, R. Palmgren, K. Keiding, P.H. Nielsen, Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin, *Water Res.* 30 (1996) 1749–1758.
- [21] M. Wenk, A. Zefrin Fernandis, *A manual for Biochemistry Protocols. Protein Purification*, World Scientific Publishing, 2007.
- [22] E.L. V. Harris, *Protein purification methods: a practical approach*, IRL Press, 1990.
- [23] P. Wingfield, Protein precipitation using ammonium sulfate, *Curr. Protoc. Protein Sci. Appendix 3* (2001) Appendix 3F.
- [24] J. Jimenez, F. Vedrenne, C. Denis, A. Mottet, S. Déléris, J.P. Steyer, J.A. Cacho Rivero, A statistical comparison of protein and carbohydrate characterisation methodology applied on sewage sludge samples, *Water Res.* 47 (2013) 1751–1762.
- [25] J.E. Noble, M.J.A. Bailey, Chapter 8 Quantitation of Protein, 1st ed., Elsevier Inc., 2009.

- [26] F.Z. Kutay, Interference study should be performed for every protein measurement method used, (2001) 427–430.
- [27] R.C. Krieg, Y. Dong, K. Schwamborn, R. Knuechel, Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 65 (2005) 13–19.
- [28] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [29] M. Dubois, K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
- [30] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, 2007.
- [31] H.. Holz, Lo que debiera saberse sobre la microscopia de fluorescencia. ZEISS, 4th ed., n.d.
- [32] O. Nosyk, E. ter Haseborg, U. Metzger, F.H. Frimmel, A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization, *J. Microbiol. Methods.* 75 (2008) 449–456.
- [33] F.Y. Sun, X.M. Wang, X.Y. Li, Visualisation and characterisation of biopolymer clusters in a submerged membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 325 (2008) 691–697.
- [34] L. Borrás, Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de València, 2008.
- [35] G.W. Ramírez, J.. Alonso, A. Villanueva, R. Guardino, J.A. Basiero, I. Bernecer, J.J. Morenilla, A rapid, direct method for assessing chlorine effect on filamentous bacteria in activated sludge, *Water Res.* 34 (2000) 3894–3898.
- [36] L.E. Chávez De Paz, Image Analysis Software Based on Color Segmentation for Characterization of Viability and Physiological Activity of Biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 1734–1739.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ENSAYOS PRELIMINARES

1.1. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

En estudios previos se estudió el método de toma de muestra y conservación del licor de mezcla. Para ello, se tomaron 3 muestras del mismo MBR y se transportaron al laboratorio en condiciones distintas:

- Muestra enfriada en una nevera portátil
- Muestra aireada a temperatura ambiente
- Muestra a temperatura ambiente

A continuación, se llevó a cabo el mismo proceso de extracción de EPS en las 3 muestras y se analizaron las proteínas y carbohidratos presentes en los SMP y eEPS extraídas. Los resultados concluyeron que en el análisis de proteínas no hubo diferencia significativa entre transportar la muestra a temperatura ambiente o refrigerada y en cuanto a los carbohidratos con la muestra de refrigerada se obtuvo una mayor concentración, tanto para SMP como para EPS extraídas. Sin embargo, con la muestra aireada el contenido de proteínas y carbohidratos disminuyó. Esto se debe a que la presencia de oxígeno hace que los microorganismos oxiden la materia orgánica de la que disponen en ausencia de sustrato externo.

A partir de estos resultados, se decidió transportar las muestras refrigeradas y mantenerlas a 4°C una vez recibidas en el laboratorio. De este modo también se evitó la influencia de los cambios de temperatura estacionales.

1.2. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Dado que en bibliografía se encontraron distintos protocolos de extracción de las sustancias poliméricas extracelulares (eEPS) del licor de mezcla [1–4] y que, a pesar del tiempo que se está investigando en este campo no existe un protocolo estandarizado [5,6], en un estudio preliminar a esta tesis se seleccionaron y compararon distintos métodos de extracción de eEPS y se midieron las concentraciones de proteínas, carbohidratos y ADN que se obtenían con cada uno de ellos.

- Homogeneizador + resina de intercambio catiónico (CER 1 etapa)
- Resina de intercambio catiónico en dos etapas (CER 2 etapas)
- Triton X-100 0.5% en dos etapas
- Triton X-100 0.25% en dos etapas
- Homogeneizador Ultra-Turrax en dos etapas

En este estudio se concluyó que los métodos que mayor concentración de proteínas y carbohidratos extraían era los que utilizaban el Triton X-100 (130-160 mgBSA/gSSV y 22-26 mgGlucosa/gSSV), seguido de los dos métodos que utilizaban la resina CER (38-57 mgBSA/gSSV y 6-7 mgGlucosa/gSSV). El método con el homogeneizador Ultra-Turrax apenas extrajo 20 mgBSA/gSSV y 4 mgGlucosa/gSSV, por lo que se descartó para estudios posteriores.

En cuando a la concentración de ADN, los métodos que mayor concentración extrajeron fueron los que utilizaban Triton X-100. Se observaron resultados similares para las dos concentraciones de detergente ensayadas (0,5% y 0,25%).

Como conclusión, se decidió utilizar en la presente tesis los métodos 0.5% Triton X-100, resina CER en 2 etapas y homogeneizador + resina (CER en 1 etapa), descartándose el método físico de homogeneización con Ultra-turrax y el método Triton X-100 con una concentración del 0.25%.

1.3. SELECCIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Existen diferentes métodos de análisis de proteínas y carbohidratos [7]. Para la selección de métodos se utilizó el Método de Adición Estándar (descrito en el apartado 4.3 del Capítulo III), con el fin de comprobar que no hubiera interferencias entre el método de extracción y el método analítico, o entre la propia muestra y el método analítico.

Los métodos de análisis de proteínas que se compararon fueron: **BCA**, **Lowry** y **Bradford**. El método Bradford se descartó por no ser un método lineal a elevadas concentraciones de proteínas y que presenta además interferencias con detergentes.

El método de Lowry se ha observado que produce interferencias en presencia de detergentes, como el Triton X-100, con el que presenta interferencias en concentraciones superiores al 0.031% de Triton X-100 [8], por lo que este método no se puede utilizar en el caso de que el proceso de extracción se realice con Triton X-100.

El método BCA es el más sensible de los tres métodos estudiados y el que menos interferencias provoca, llegando a ser compatible con concentraciones de Triton X-100 del 5% [8].

En cuanto a la comparación de los métodos BCA y Lowry, Ras et al. (2008) concluyeron que aunque ambos métodos eran válidos, el método BCA ofrecía una mayor precisión para la cuantificación de eEPS en fangos [1].

En la Figura IV.1 se muestra el método de adición estándar aplicado al análisis de proteínas mediante el método BCA a las muestras de EPS extraídas con Triton X-100, CER en 1 etapa, CER en 2 etapas y Ultra-turrax. También se muestra la recta de calibrado (RC) obtenida utilizando la proteína BSA como estándar. En el caso de que la extracción se realice en 2 etapas se ha seleccionado la muestra de la segunda etapa.

Resultados y Discusión

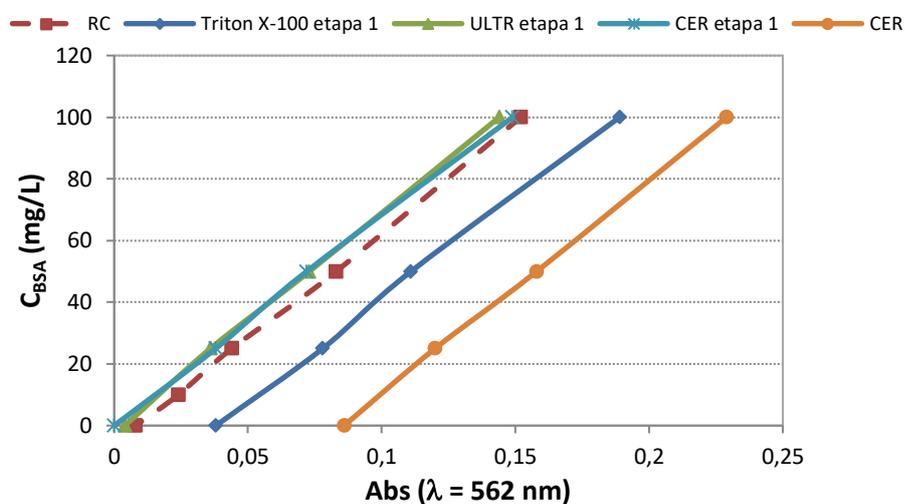


Figura IV.1: Método de Adición Estándar aplicado al análisis de proteínas con ácido bicinconínico (BCA)

En cuanto a los carbohidratos se compararon los siguientes métodos de análisis: **Antrona**, **Dubois** y **Hexoquinasa**. El método con hexoquinasa se descartó dado que ésta se puede utilizar para analizar exclusivamente glucosa. En la Figura IV.2 se observa el Método de Adición Estándar cuando se realiza el análisis de carbohidratos mediante el método Antrona. Además de la recta de calibrado (RC) se muestra un ejemplo de la segunda etapa de extracción de EPS con los métodos Triton X-100, CER en 2 etapas y Ultraturax. En el caso del método CER en una sola etapa se muestra el valor final de la extracción.

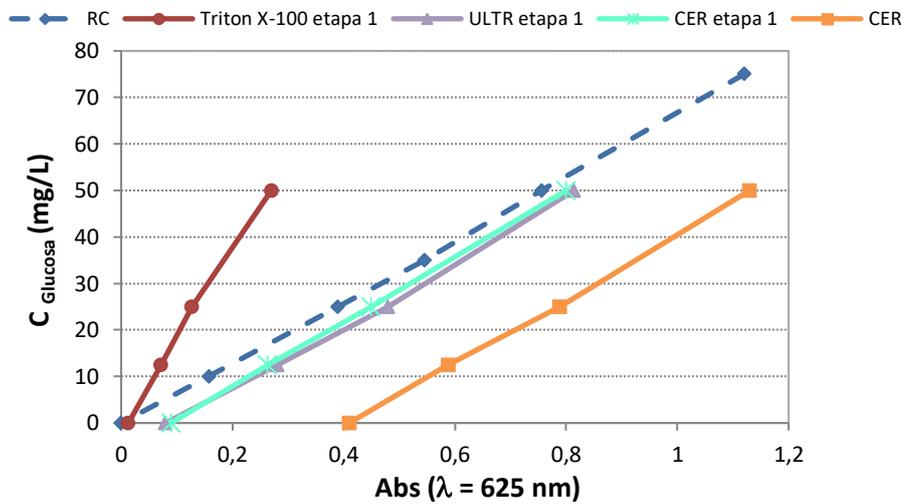


Figura IV.2: Método de Adición Estándar aplicado al análisis de carbohidratos con Antrona

Tal y como se observa en la Figura IV.2, las rectas de adición estándar de las dos extracciones con resina de intercambio catiónico CER y la extracción con Ultra-turrax, son paralelas a la recta de calibrado. En cambio, la recta de adición estándar de la muestra a la que se le ha realizado la extracción con Triton X-100 tiene una pendiente mucho más acusada. Este cambio de pendiente indica que hay una clara interferencia entre el método de extracción y el método de análisis, lo que hace que para las muestras extraídas con Triton X-100 se tenga que utilizar otro método analítico. En ese caso, el método seleccionado fue el método Dubois, con el que no presenta interferencias y sí se obtienen rectas paralelas a su RC.

Ningún método de extracción presentó interferencias con el método Dubois. Sin embargo, no se analizaron todos los carbohidratos con este método por considerarse más peligroso que el de la Antrona porque utiliza mayor cantidad de ácido sulfúrico y fenol. Ambos métodos muestran la misma linealidad y baja desviación estándar 2% Antrona y 4% Dubois [7]. Visualmente también se observaba que el color de las muestras del análisis realizado con Triton X-100 era diferente al resto de muestras.

2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL LICOR DE MEZCLA

2.1. PRODUCTOS SOLUBLES MICROBIANOS (SMP) Y SUSTANCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES EXTRAÍDAS (eEPS)

Como se ha indicado en la introducción, las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) están formadas por los SMP y las eEPS extraídas, las cuales a su vez están formadas por proteínas, carbohidratos y ADN, principalmente.

En este apartado se muestran los resultados de la caracterización química del fango: concentración de SMP, eEPS y EPS así como la concentración de sus componentes (proteínas, carbohidratos y ADN).

Los métodos de extracción de las sustancias poliméricas extracelulares (eEPS) seleccionados fueron Triton X-100 (en concentración 0.5%) y la resina de intercambio catiónico CER (en 1 y 2 etapas), descritos en el Capítulo III, sección 4.1. Los métodos analíticos seleccionados fueron Dubois, Antrona y BCA. La descripción de los métodos analíticos para determinar las proteínas, los carbohidratos y, adicionalmente el ADN, se encuentra descrita en el Capítulo III, sección 4.4.

En la Figura IV.3 se muestran los resultados de los productos solubles microbianos (SMP) de las 40 muestras analizadas en el MBR urbano. Los valores de SMP se expresan en mg/L ya que se encuentran en disolución. Estos se han obtenido tras aplicar el Método de Adición Estándar a cada una de las muestras para comprobar que no existen interferencias entre el método de extracción o la muestra con los métodos analíticos aplicados.

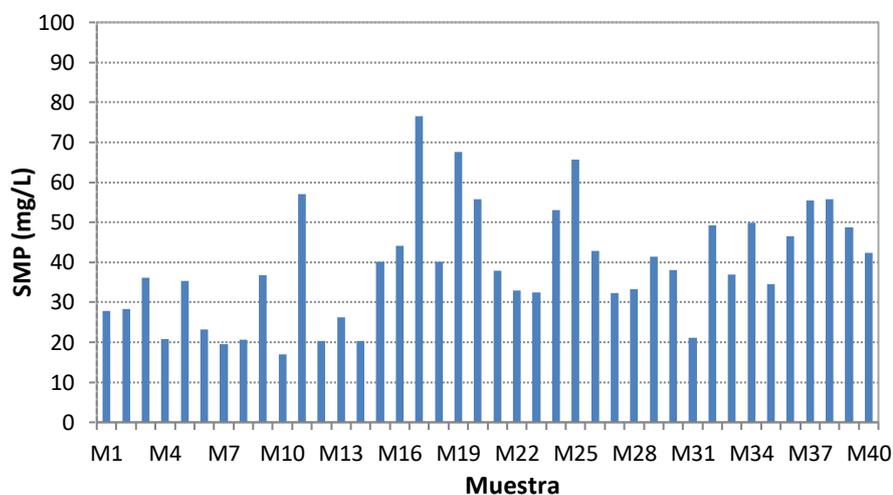


Figura IV.3: Concentración de los productos solubles microbianos (SMP) en las 40 muestras

La Tabla IV.1 resume las concentraciones de SMP promedios obtenidos en las 40 muestras con su desviación estándar. Se presenta el valor total, así como el valor de las tres fracciones analizadas (proteínas, carbohidratos y ADN) y el ratio proteína-carbohidrato obtenido.

Tabla IV.1: Productos solubles microbianos (SMP) y sus componentes

	SMP _{total} (mg/L)	Proteínas (mgBSA/L)	Carbohidratos (mgGlucosa/L)	ADN (mg/L)	P/C ratio
SMP	39.1 ± 14	22.9 ± 7	15.7 ± 13	0.53 ± 0.3	1.46

Se observa que el mayor componente de los SMP son las proteínas. La presencia de ADN en los SMP fue debida a los restos celulares que incluyen células muertas.

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) están formadas por SMP y EPS extraídas (eEPS), siendo mayoritariamente las eEPS. Dependiendo del método de extracción aplicado variará la proporción de ambos componentes.

Resultados y Discusión

En la Tabla IV.2 se muestran las concentraciones de las EPS obtenidas, en las 40 muestras de licor de mezcla procesadas, utilizando el método Triton X-100 para extraer las EPS. En el Anexo III se muestran los valores obtenidos con las extracciones con los métodos CER. Se presentan las EPS totales (suma de SMP y eEPS) así como las proteínas, carbohidratos y ADN que componen las EPS extraídas (eEPS). Dado que el método de extracción se ha realizado en 2 etapas, el valor mostrado corresponde a la suma de la concentración obtenida en las 2 etapas de extracción. También se presenta el ratio proteína-carbohidrato de cada una de las muestras. Los valores de de las concentraciones de EPS se expresan en mg/gSSV dado que se trata de compuestos extraídos de las paredes celulares. De este modo los resultados pueden ser comparables.

En la tabla también se incluye el ratio proteína-carbohidrato de cada una de las muestras.

Tabla IV.2: EPS totales, componentes de las eEPS extraídas con el método Triton X-100 y ratio proteína/carbohidrato

TRITON X-100	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
EPS (mg/gSSV)	110.2	107.9	118.2	115.2	111.1	116.2	123.7	102.2	95.0	102.6
Proteínas (mgBSA/gSSV)	91.04	87.88	100.58	99.07	86.73	97.79	99.74	86.08	77.17	84.31
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	9.75	11.5	9.78	9.12	11.49	8.81	13.09	8.54	9.12	10.56
ADN (mg/gSSV)	5.91	4.83	4.14	3.58	6.49	5.36	4.84	4.37	3.37	5.28
Ratio P/C	9.3	7.6	10.3	10.9	7.5	11.1	7.6	10.1	8.5	8.0
	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20
EPS (mg/gSSV)	84.7	91.9	97.0	95.3	89.8	93.1	89.0	74.2	113.8	103.6
Proteínas (mgBSA/gSSV)	61.91	71.02	76.	76.86	69.75	71.3	64.8	57.63	90.89	82.35
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	10.91	12.43	10.99	10.99	10.4	10.17	11.74	7.21	9.12	10.29
ADN (mg/gSSV)	4.52	5.9	6.73	4.75	4.11	6.19	4.25	4.98	5.58	4.89
Ratio P/C	5.7	5.7	6.9	7.0	6.7	7.0	5.5	8.0	10.0	8.0

Resultados y Discusión

Tabla IV.2 (Cont.): EPS totales, componentes de las eEPS extraídas con el método Triton X-100 y ratio P/C

TRITON X-100	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30
EPS (mg/SSV)	87.68	111.16	89.42	108.68	87.57	119.42	95.31	97.93	90.89	54.72
Proteínas (mgBSA/gSSV)	63.53	86.56	71.95	88.98	70.07	97.24	80.34	80.77	76.13	41.17
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	19.76	19.7	14.5	14.47	14.6	19.2	11.83	14.84	12.23	12.16
ADN (mg/gSSV)	4.4	4.91	2.97	5.22	2.9	2.98	3.14	2.32	2.53	1.4
Ratio P/C	3.2	4.4	5.0	6.1	4.8	5.1	6.8	5.4	6.2	3.4
	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40
EPS (mg/SSV)	84.98	77.22	60.27	78.10	70.76	86.78	91.41	81.67	77.56	98.05
Proteínas (mgBSA/gSSV)	71.03	64.61	45.48	59.45	53.92	66.17	71.22	65.61	60.25	79.64
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	11.98	10.69	13.5	16.27	14.98	17.74	17.62	12.53	14.54	15.89
ADN (mg/gSSV)	1.96	1.93	1.3	2.37	1.86	2.88	2.57	3.54	2.77	2.53
Ratio P/C	5.9	6.0	3.4	3.7	3.6	3.7	4.0	5.2	4.1	5.0

Los resultados obtenidos con los métodos CER se encuentran en el Anexo III.

En la Figura IV.4 y la Figura IV.5 se representan las concentraciones de proteínas y carbohidratos contenidos en las eEPS extraídas con los métodos de extracción Triton X-100 y CER en 2 etapas en las 40 muestras. Cada valor es resultado de la suma de las concentraciones obtenidas en cada una de las dos etapas de la extracción realizada. Al igual que se ha comentado ante, los valores se han obtenido tras aplicar el Método de Adición Estándar a cada una de las muestras para comprobar que no existen interferencias.

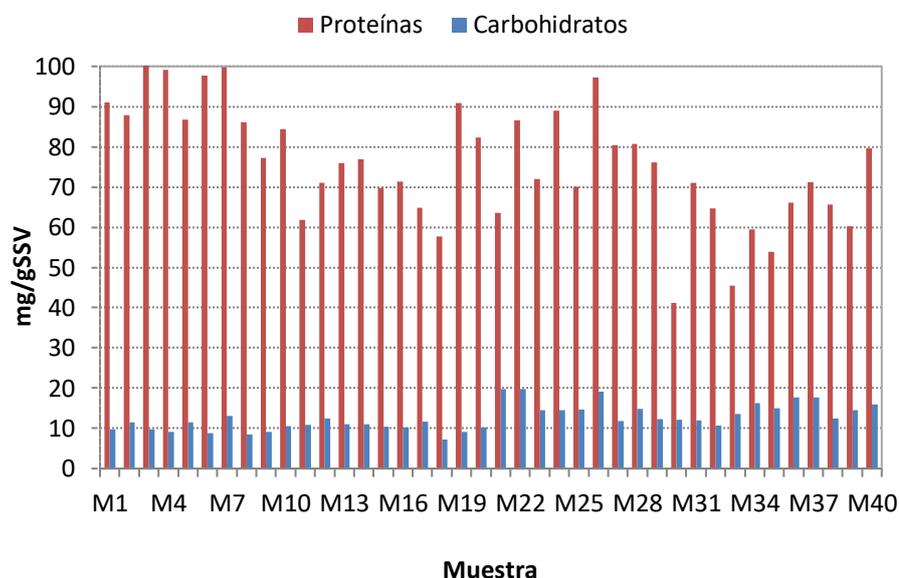


Figura IV.4: Concentración de proteínas y carbohidratos contenidos en las eEPS extraídas con el método Triton X-100

En la Figura IV.4 se observa que mediante el método Triton la concentración de carbohidratos en las eEPS varió en un rango entre 9 - 19 mgGlucosa/gSSV, mientras que la concentración de proteínas varió entre 45-100 mgBSA/gSSV, presentando una mayor variabilidad para este parámetro.

Resultados y Discusión

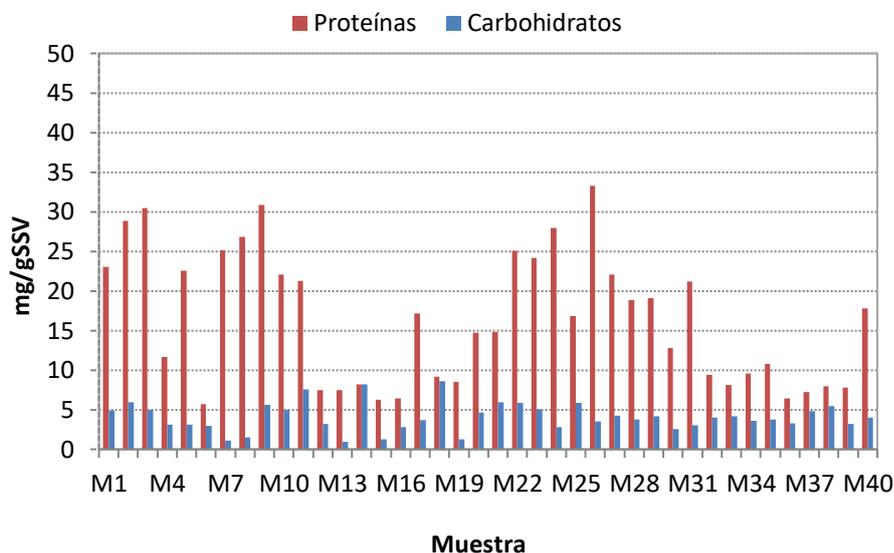


Figura IV.5: Concentración de proteínas y carbohidratos contenidos en las EPS extraídas con CER en 2 etapas

En la Figura IV.5 se puede ver cómo el método CER en 2 etapas extrajo un rango de proteínas con una concentración variable entre 6-33 mgBSA/gSSV frente a la de carbohidratos con un rango entre 1-8 mgGlucosa/gSSV.

Si se comparan ambos métodos de extracción, cabe indicar que la concentración de proteínas siempre fue superior a la de los carbohidratos. Sin embargo, con el método CER (en 2 etapas) el rango de concentraciones extraídas tanto para las proteínas como los carbohidratos fue menor y su variabilidad aumentó.

Dada la variabilidad encontrada, a partir de la muestra 6 se decidió realizar la extracción también con el método CER en una sola etapa de mayor duración y realizando una lisis previa con el homogeneizador (descrita en el Capítulo III sección 4.1.2). En la Figura IV.6 se muestra la concentración de proteínas y carbohidratos de las EPS extraídas con este método a partir de la muestra 6. Los valores se han obtenido tras aplicar el Método de Adición Estándar a cada una de las muestras para comprobar

que no existen interferencias entre los métodos analíticos y el método de extracción.

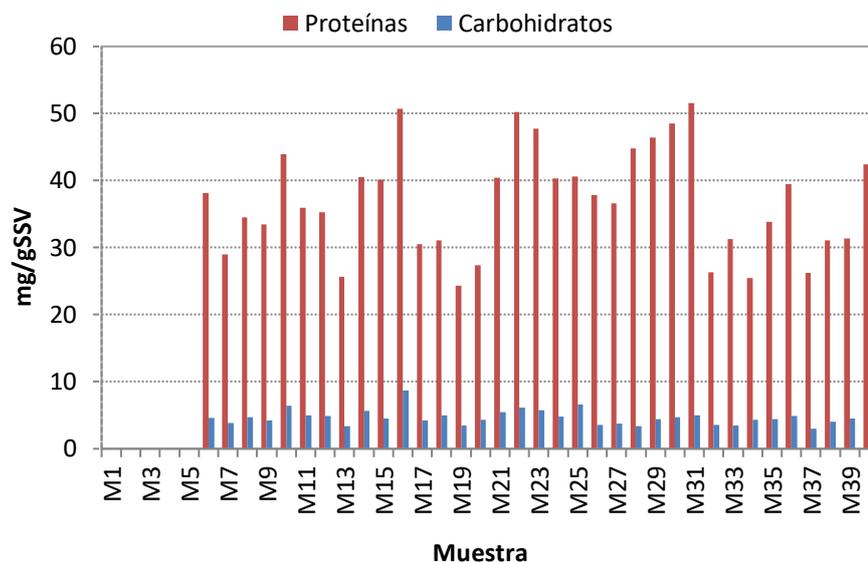


Figura IV.6: Concentración de proteínas y carbohidratos contenidos en las EPS extraídas con CER en 1 etapa

Los resultados de la Figura IV.6 muestran como el método CER en una etapa extrae mayor concentración de proteínas que si la extracción se realiza en dos etapas. Además, la variabilidad disminuye.

Los diferentes valores obtenidos entre los métodos de extracción CER y Triton X-100 se atribuyen a la mayor capacidad de extracción del Triton X-100. De hecho, algunos investigadores afirman la presencia de dos tipos de polímeros en los floculos, uno que está estrechamente unido a las células y formando micro-colonias de células y otro ligeramente unido en la matriz del floculo y en las partes externas de los floculos. De este modo, los resultados pueden indicar que los protocolos basados en el uso de la resina de intercambio CER extrajeron principalmente las EPS ligeramente unidas a las células, mientras que Triton X-100 extrajo ambos tipos de polímeros.

Resultados y Discusión

En la extracción llevada a cabo con Triton X-100, las EPS están formadas por un 5% de SMP y un 95% de eEPS. En cambio, con los métodos de extracción que emplearon la resina se obtuvieron valores entre 5 y 17% de SMP y 91 y 83% de eEPS (dependiendo de si se la extracción se realizaba en 1 o 2 etapas). Por tanto, se observa que el método Triton X-100 fue el que mayor cantidad de eEPS extrajo para el mismo fango activo. Estos resultados muestran que las concentraciones de eEPS extraídas dependieron del método de extracción aplicado tal y como apunta la bibliografía [6,9].

En bibliografía se han encontrado diferentes rangos de EPS para diferentes tipos de extracción: 26-165 mgEPS/gSSV, 6–254mgEPS/g SSV o 127–432mgEPS/g SSV [10,11]. Concretamente para la extracción con resina CER se han obtenido variaciones entre 57.8 y 109 mgEPS/gSSV [11,12]. Como se puede observar, la variabilidad fue el factor común de todas las referencias bibliográficas encontradas.

En el caso de la extracción con Triton X-100 se ha obtenido una concentración promedio de 96.5 mgEPS/gSSV, mientras que Ras et al. (2008) obtuvieron una concentración de 193.4 mgEPS/gSSV [1]. Estos autores compararon también el método CER con el método Triton X-100 y, al igual que en el presente trabajo, obtuvieron mayores concentraciones de EPS con el método Triton X-100, pero la diferencia no fue tan significativa (con el método CER extrajeron 101.9 mgEPS/gSSV).

En la Tabla IV.3 se muestra a modo de resumen la concentración de las EPS (suma de SMP y eEPS extraídas) utilizando los tres métodos que se han comparado: 0.5% Triton X-100, resina CER en una etapa y en 2 etapas. En el caso de que el método de extracción sea en 2 etapas (caso de Triton X-100 y CER en 2 etapas), el valor mostrado corresponde a la suma de la concentración obtenida en las 2 etapas de extracción. También se muestra la composición (proteínas, carbohidratos y ADN) de las EPS extraídas con dichos métodos, así como el ratio proteína-carbohidrato obtenido tras la extracción.

Tabla IV.3: Concentración y composición de las eEPS extraídas con los métodos Triton X-100, CER en una etapa y en dos etapas. Ratio P/C

	eEPS (mg/gSSV)	Proteínas (mgBSA/gSSV)	Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	ADN (mg/gSSV)	P/C ratio
TRITON X-100	92.21 ± 15	75.7 ± 14.6	12.6 ± 3.2	3.9 ± 1.5	6
CER 1 etapa	43.9 ± 9	37.2 ± 8	4.7 ± 1.2	1.9 ± 1.6	7.8
CER 2 etapas	21.93 ± 8	16.3 ± 8	4.07 ± 1.8	1.4 ± 0.7	4

Tal y como se observa en la Tabla IV.3, el método Triton X-100 es el que mayor concentración de sustancias poliméricas extracelulares consigue extraer. Si se compara el ratio P/C obtenido en los SMP con el obtenido en las EPS se observa que este aumenta debido a la extracción realizada. En los resultados bibliográficos encontrados, el ratio P/C varía generalmente entre 2 y 10 [13], lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

Comparando el valor de ADN medido en los SMP (0.06 mg/gSSV) con el valor obtenido en las EPS (3.9, 1.9 y 1.4 mg/gSSV tras las extracciones con Triton X-100, CER 1 etapa y CER 2 etapas, respectivamente), se observa que el ADN aumentó. Esto fue debido a la liberación de material intracelular causada por la ruptura celular durante el proceso de extracción.

Liu y Fang (2003) indicaron que dependiendo del método de extracción aplicado y del origen del fango, la concentración de ADN podía variar entre 0 y 25 mg/gSSV [13]. Comte et al. (2006) tras estudiar la composición de las EPS y obtener valores de ADN inferiores a 8 mg/gSSV concluyeron que esa cantidad no contaminaba las EPS. Frolund et al. (1995) tras 2h de extracción con CER obtuvieron valores cercanos a 8 mg/gSV [10]. Los valores obtenidos en el presente trabajo no superaron este umbral de concentración de ADN, lo cual indica que las extracciones aplicadas no fueron agresivas y, aunque se liberó material intracelular (indicado por el

Resultados y Discusión

incremento en la concentración de ADN), las cantidades liberadas de proteínas y carbohidratos intracelulares no fueron significativas frente a las extraídas de la membrana celular.

En la Figura IV.7 se representa la distribución de la composición de las eEPS teniendo en cuenta las proteínas, carbohidratos y ADN para cada método de extracción realizado: Triton X-100, CER 1 etapa y CER 2 etapas.

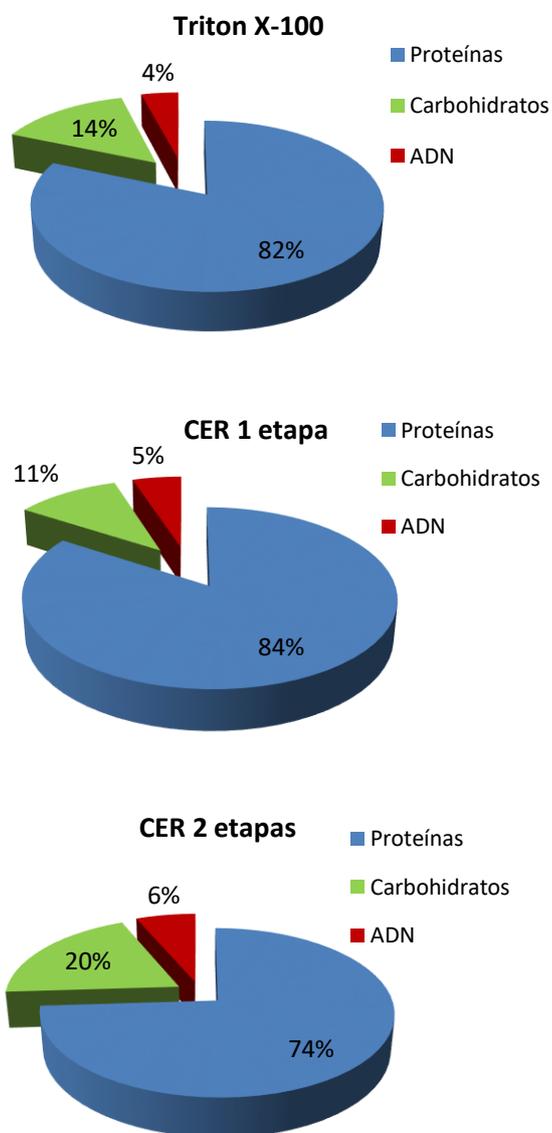


Figura IV.7: Distribución de proteínas, carbohidratos y ADN en las eEPS extraídas con los métodos Triton X-100, CER 1 etapa y CER 2 etapas

En las tres extracciones de eEPS, la concentración de proteínas fue superior a la de carbohidratos, por lo que se puede concluir que el mayor

componente de las eEPS son las proteínas. El ADN presenta la menor concentración en los tres casos (entre un 4 y un 6%).

El método que menos proteínas extrajo y más porcentaje de ADN liberó fue el método CER en 2 etapas. Los métodos que emplean la resina CER extrajeron mayor porcentaje de ADN, por lo que se puede concluir que son más agresivos que el método Triton X-100.

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL LICOR DE MEZCLA

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en la caracterización física del licor de mezcla, incluyendo su correlación con los parámetros químicos anteriormente explicados, en el caso de existir dicha correlación.

3.1. REOLOGÍA DEL FANGO ACTIVO

La viscosidad del licor de mezcla en un MBR está relacionada con la concentración de sólidos y contribuye al ensuciamiento de las membranas [14]. Como se ha dicho en la el capítulo III, sección 3.1, el fango activo tiene un comportamiento no-Newtoniano, lo que implica que la relación entre la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) y el esfuerzo cortante (τ) no es proporcional.

Para el estudio del comportamiento reológico del fango activo se han procesado 20 muestras procedentes del reactor de fangos activos de una EDAR urbana. En la Figura IV.8 se representa, para cada muestra, la evolución del esfuerzo cortante en un rango de velocidades de deformación de 0 a 800 s^{-1} .

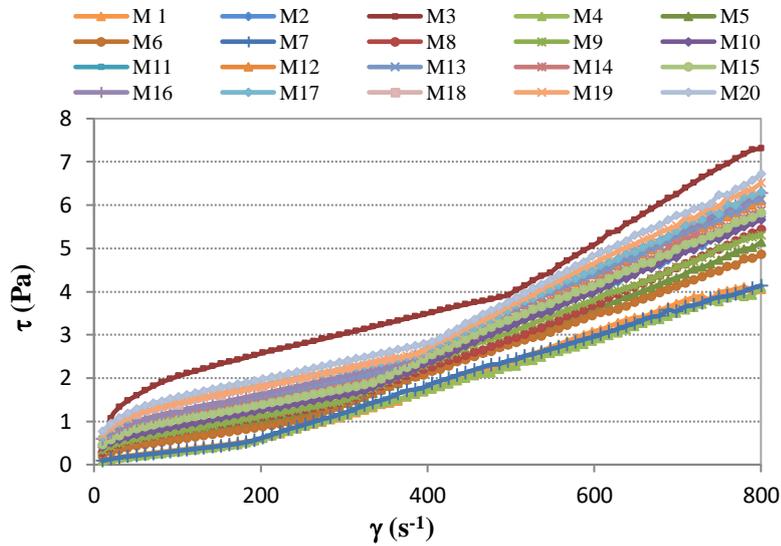


Figura IV.8: Evolución del esfuerzo cortante a diferentes velocidades de deformación en las 20 muestras de licor de mezcla procedentes del MBR urbano

En general, tal y como se observa en la Figura IV.8, τ aumenta con $\dot{\gamma}$, variando entre 0 y 7 Pa. Dado que la tendencia en todas las muestras fue similar, se selecciona a modo de ejemplo, la muestra M19 para continuar con la explicación de los resultados.

En la Figura IV.9, se representa, para la muestra seleccionada, la evolución de la viscosidad y del esfuerzo cortante a una velocidad de deformación de 0 a $800 s^{-1}$. Con el fin de estudiar la posible existencia de tixotropía, la medida se realizó aumentando y disminuyendo la velocidad de deformación.

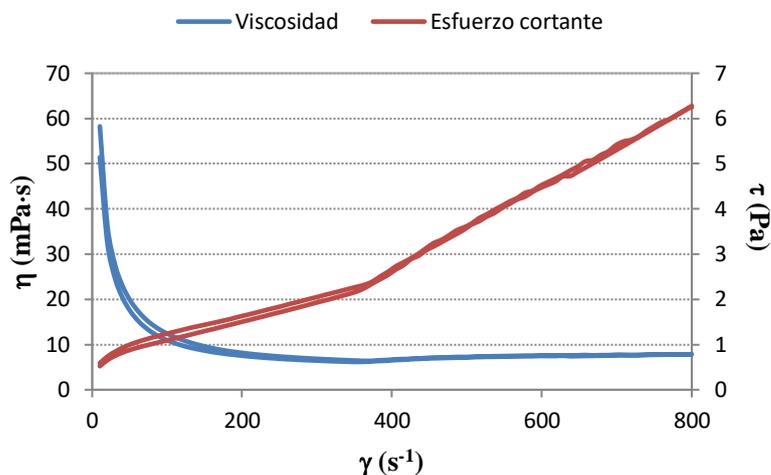


Figura IV.9: Viscosidad aparente y esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación de la muestra del licor de mezcla M19

Teniendo en cuenta que la histéresis producida entre la curva ascendente y la curva descendente es despreciable tanto para la viscosidad como para el esfuerzo cortante, se puede concluir que el fango activo estudiado no tiene un comportamiento tixotrópico.

Por otro lado, se observa que a partir de 400 s^{-1} aproximadamente se produce un ligero aumento de la viscosidad y un aumento de la pendiente del esfuerzo cortante. Este cambio en el comportamiento del fluido puede ser debido a que a partir de esta velocidad empiezan a generarse vórtices de Taylor.

Con el fin de justificar la causa del incremento de pendientes que aparece en la Figura IV.9 alrededor de los 400 s^{-1} (tanto en η como en τ) se ha calculado el número de Taylor (Ta) utilizando la Ec. III.8 (Capítulo III, sección 3.2).

Así en la Figura III.10, se representa el valor del número de Taylor frente a la velocidad de deformación en el rango de 0 a 800 s^{-1} . Se puede observar como el número de Ta aumenta con la velocidad de deformación aplicada

en el reómetro $\dot{\gamma}$, al igual que sucedía con η y τ , también se produce un cambio en el comportamiento del número de Ta alrededor de los 400 s^{-1} , correspondiendo a un Ta de 32.4.

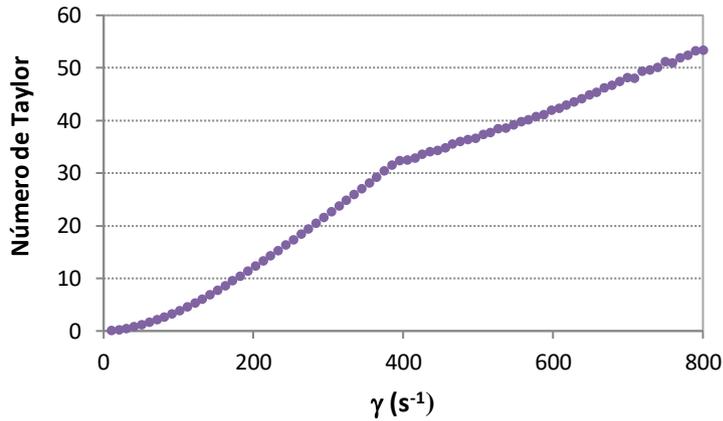


Figura IV.10: Número de Taylor frente a las velocidades de deformación ensayadas para la muestra de licor de mezcla M19

Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios [15,16] en los que se considera que a partir de números de Ta mayores de 41.3 (Ta crítico) se generan vórtices de Taylor. En el presente caso, debido a las condiciones reológicas del fango, el cambio en el comportamiento del fluido se produce antes de alcanzar el Ta crítico pero se puede afirmar que este cambio de pendiente es debido a la formación de los vórtices.

En la Figura IV.11 se puede observar la influencia de la concentración de sólidos en el licor de mezcla (SSLM) en la aparición de los vórtices de Taylor, es decir, el cambio de régimen laminar a turbulento. Para ello, se representa la evolución de la viscosidad aparente con el aumento de la velocidad de deformación para seis muestras del total de las veinte.

Resultados y Discusión

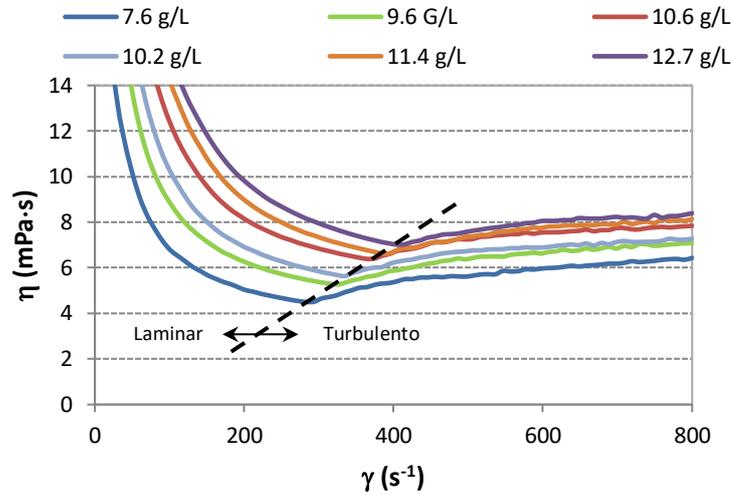


Figura IV.11: Influencia de la concentración de los sólidos en suspensión en el licor de mezcla en la formación del vórtice de Taylor

La formación del vórtice de Taylor produce un aumento repentino de la viscosidad aparente, que puede ser erróneamente atribuido al comportamiento dilatante del fango [16]. Tal y como se observa en la Figura IV.11, el inicio de la turbulencia se produce a velocidades más elevadas para concentraciones de SSLM mayores. La distancia entre la punta del cilindro interior (giratorio) y el fondo del cilindro exterior (a) (Fig. III.10, capítulo III sección 3.2.1) afecta al comienzo de la turbulencia, siendo recomendado una distancia a pequeña pero de mayor tamaño que las partículas del fango [17].

En la Figura IV.12, se muestra la evolución de la viscosidad aparente con la concentración de sólidos a diferentes velocidades de deformación para 20 muestras. Se han seleccionado velocidades de deformación que no generan vórtices de Taylor.

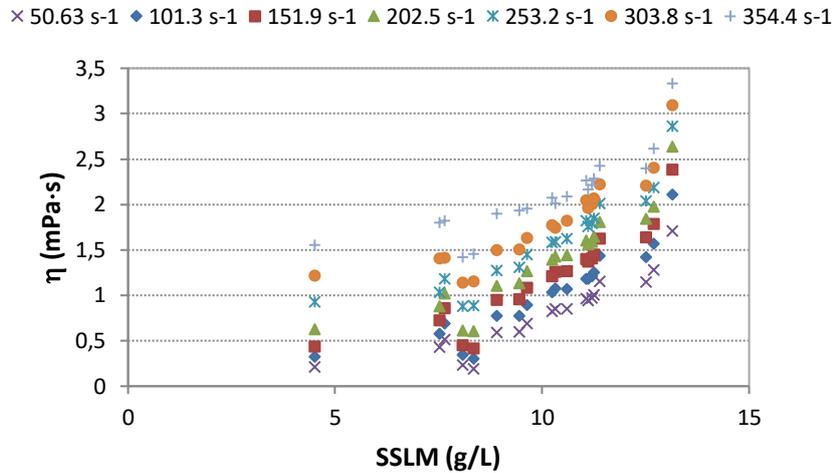


Figura IV.12: Evolución de la viscosidad aparente con la concentración de sólidos en suspensión de licor de mezcla, a siete velocidades de deformación en régimen laminar

Se observa que existe una gran influencia de los SSLM en la viscosidad, lo cual se confirma calculando el coeficiente de correlación de Pearson con un valor de $r_p = 0.9020$ y un P-valor = 0.0000. P-valores inferiores a 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95.0%.

Otros autores han demostrado que, aunque la viscosidad aumenta con la concentración de SSLM, existe una concentración de sólidos crítica, por debajo de la cual, la viscosidad permanece baja y asciende lentamente con los sólidos y, por encima de la cual, la viscosidad asciende exponencialmente. Esta concentración crítica de sólidos varía en función de las características del agua residual tratada y de los parámetros de operación del reactor de fangos activos (carga másica, edad del fango...) [18].

A la vista del gráfico de la Figura IV.12, se observa que a partir de 8.4 g/L se produce un aumento exponencial de la viscosidad del fango con el aumento de los SSLM. Sin embargo, por debajo de esta concentración crítica de sólidos la viscosidad apenas varía. De este modo, la viscosidad de

Resultados y Discusión

la muestra con una concentración de SSLM de 4.5 g/L es prácticamente igual a la de las muestras cercanas a 8 g/L, lo que podría explicarse por la baja concentración de productos solubles microbianos (SMP) obtenidos, concretamente de los carbohidratos, en estas muestras de licor de mezcla en las cuales se ha obtenido un valor en torno a de 2 mg_{Glucosa}/L, frente a los 15 mg_{Glucosa}/L de media.

Los resultados experimentales han sido también interpretados comparando cuatro modelos empíricos diferentes: Ostwald de Waele, Bingham, Herschel-Bulkley y Casson, ya que como se ha descrito en la sección 3.1, son los más comúnmente aplicados en bibliografía para el licor de mezcla [3, 6, 7].

En la Tabla IV.4 se muestran el resultado de los parámetros para cada uno de los modelos aplicados así como también el coeficiente de correlación (R^2) obtenido en cada uno de ellos. En concreto, se muestran los resultados para la muestra M19 con una concentración de SSLM de 11.4 g/L.

Tabla IV.4: Parámetros de los modelos reológicos aplicados y coeficiente de correlación para la muestra de licor de mezcla M19

Modelo de Ostwald			
K	n	R^2	
0,255	0,375	0,996	
Modelo de Bingham			
t_0	h_p	R^2	
0,832	0,005	0,965	
Modelo de Herschel-Bulkley			
K	n	t_0	R^2
0,163	0,445	0,148	0,994
Modelo de Casson			
n	t_0	h_p	R^2
0,5	0,511	0,002	0,988

Tal y como se observa en la Tabla IV.4 el ajuste obtenido con los cuatro modelos simula con exactitud los resultados experimentales, ya que el coeficiente R^2 es superior a 0.96 en todos los casos.

En la Figura IV.13 se representa, a modo de ejemplo, el reograma obtenido experimentalmente para la muestra M19 y los ajustes obtenidos con los cuatro modelos reológicos aplicados.

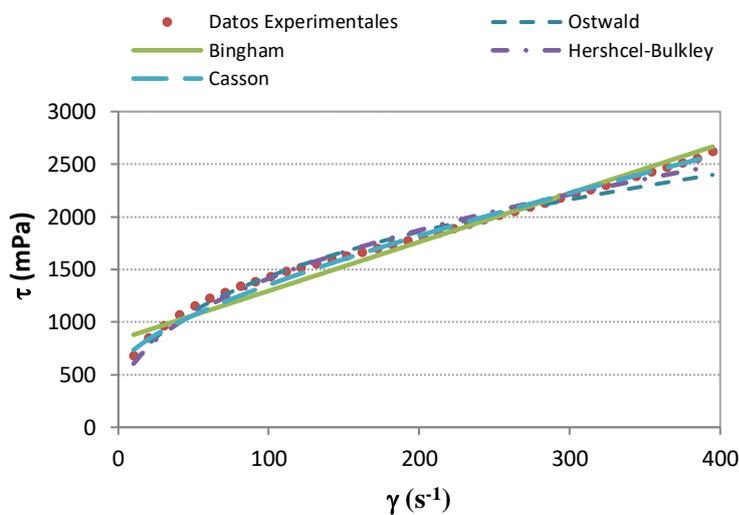


Figura IV.13: Reograma experimental y ajustes de los modelos de Ostwald, Bingham, Herschel-Bulkley y Casson para la muestra M19

Tal y como se observa en la Figura IV.13 los modelos aplicados se ajustan, en general, muy bien a los valores obtenidos experimentalmente al obtener R^2 superiores al 95%. Teniendo en cuenta el R^2 obtenido, el modelo de Ostwald ha sido seleccionado como el modelo que mejor predice la reología del fango activo estudiado mientras que el modelo de Bingham es el que peor ajustó al ser un modelo lineal.

A modo de ejemplo se representa en la Figura IV.14Figura IV.15 (para la muestra M19) tanto la viscosidad aparente como el esfuerzo cortante en función de la velocidad de deformación obtenidos experimentalmente y mediante la aplicación del modelo de Ostwald, donde $\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$ y $\tau =$

Resultados y Discusión

$K \cdot \dot{\gamma}^n$, siendo K el índice de consistencia y n el índice de comportamiento del fluido.

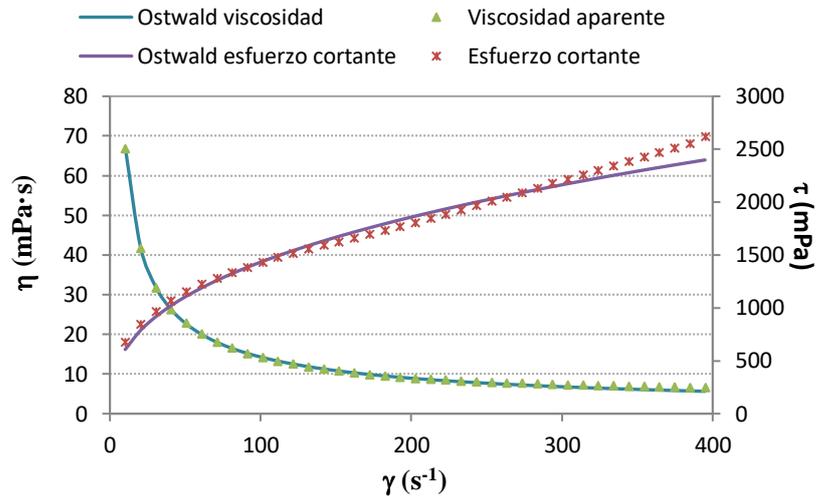


Figura IV.14: Reograma obtenido experimentalmente y ajuste obtenido mediante el modelo de Ostwald ($n = 0.3752$, $k = 0.2545$ mPa) para la muestra M19 (SSLM = 11.4 g/L)

Para el resto de muestras la tendencia observada fue similar a la de la muestra representada en las figuras anteriores.

3.2. RESISTENCIAS A LA FILTRACIÓN

3.2.1. Cálculo de las resistencias a la filtración

La determinación de las resistencias a la filtración es un parámetro que permite evaluar el proceso de filtración, ya que indica el ensuciamiento de la membrana al realizar un ensayo de filtración. Es un parámetro de importancia en los biorreactores de membrana, ya que el ensuciamiento de las membranas aumenta las necesidades de limpieza y el reemplazamiento de las mismas.

Tal y como se ha indicado en Materiales y Métodos (capítulo III, sección 3.6) la resistencia a la filtración (R_t) es la suma de: la resistencia intrínseca de la membrana (R_m), la resistencia causada por la formación de torta sobre la membrana y la resistencia causada por el bloqueo de poro.

El ensuciamiento de la membrana puede ser de dos tipos, reversible e irreversible. El ensuciamiento reversible está ligado a la resistencia creada por la torta que se forma sobre la membrana (R_{rev}), la cual tras un aclarado con agua se puede eliminar, mientras que el ensuciamiento irreversible está relacionado con la resistencia debida al bloqueo de los poros (R_{irrev}). De este modo, la resistencia total de la membrana se puede calcular como la suma de R_m , R_{rev} y R_{irrev} .

En primer lugar, en la Figura IV.15 se muestran las resistencias R_{rev} , R_{irrev} y R_t de las 20 muestras de licor de mezcla del MBR urbano ensayadas.

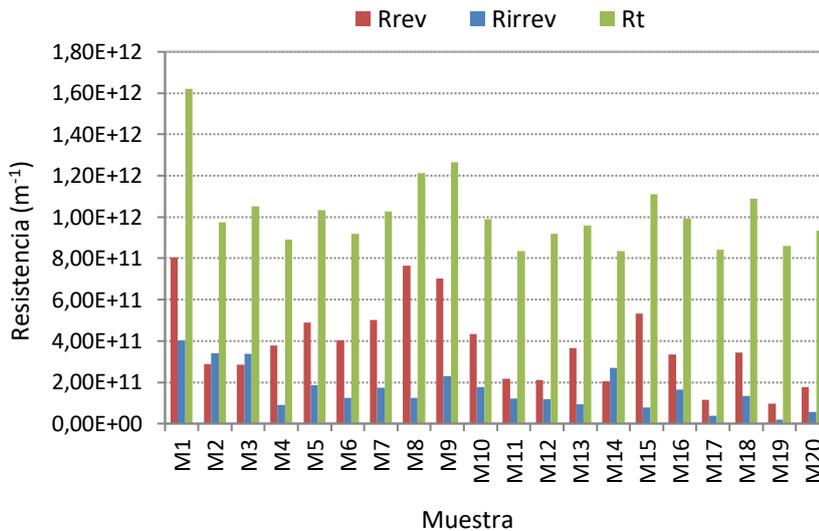


Figura IV.15: Resistencias a la filtración (R_{rev} , R_{irrev} y R_t) en las 20 muestras de licor de mezcla procedentes del MBR urbano

A continuación, en la Tabla IV.5 se presentan los valores medios obtenidos con los resultados presentados en la Figura IV.15, así como el

Resultados y Discusión

porcentaje al que cada resistencia contribuye a la resistencia total a la filtración.

Tabla IV.5: Contribución de cada tipo de resistencia a la resistencia total

R_m (m^{-1})	R_{rev} (m^{-1})	R_{irrev} (m^{-1})	R_t (m^{-1})
3.55E+11	6.91E+11	2.36E+11	1.28E+12
27.6%	53.9%	18.4%	100%

Tal y como se observa en la Tabla IV.5, la resistencia a la formación de torta (R_{rev}) es la que más contribuye al ensuciamiento de la membrana, con un 53.9%. La resistencia debida al bloqueo del poro (R_{irrev}) es inferior, del orden del 18.4%. La resistencia de la propia membrana (R_m) contribuye en un 27.6% a la resistencia total. Este valor, superior al encontrado en bibliografía, es debido al tipo de membrana empleada en los ensayos y también a que el agua residual influente no posee una carga contaminante elevada ($DQO_{promedio}$ 460 mg/L). Judd (2011) indicó que cuando la resistencia de la membrana presentaba valores elevados era debido a que el agua residual influente tenía baja carga contaminante [14].

Comparando los valores medios obtenidos en nuestra experiencia (R_{rev} = 53.9 %, R_{irrev} = 18.4 % y R_m = 27.6 %) con los obtenidos por otros autores, se observa que en todos los casos la resistencia reversible es la que en mayor medida contribuye al ensuciamiento de la membrana. Lee et al. (2001) obtuvieron en sus experiencias valores de resistencias reversible, irreversible y a la membrana de 80, 8 y 12 %, respectivamente [21]. Mientras que Zhang obtuvo valores entre 82.59 – 90.44 %, 7.31- 13.46 % y 2.25-4.35 % para R_{rev} , R_{irrev} y R_m , respectivamente [22].

En la Figura IV.16 se muestra la contribución de las resistencias reversible e irreversible en cada una de las 20 muestras de licor de mezcla analizadas.

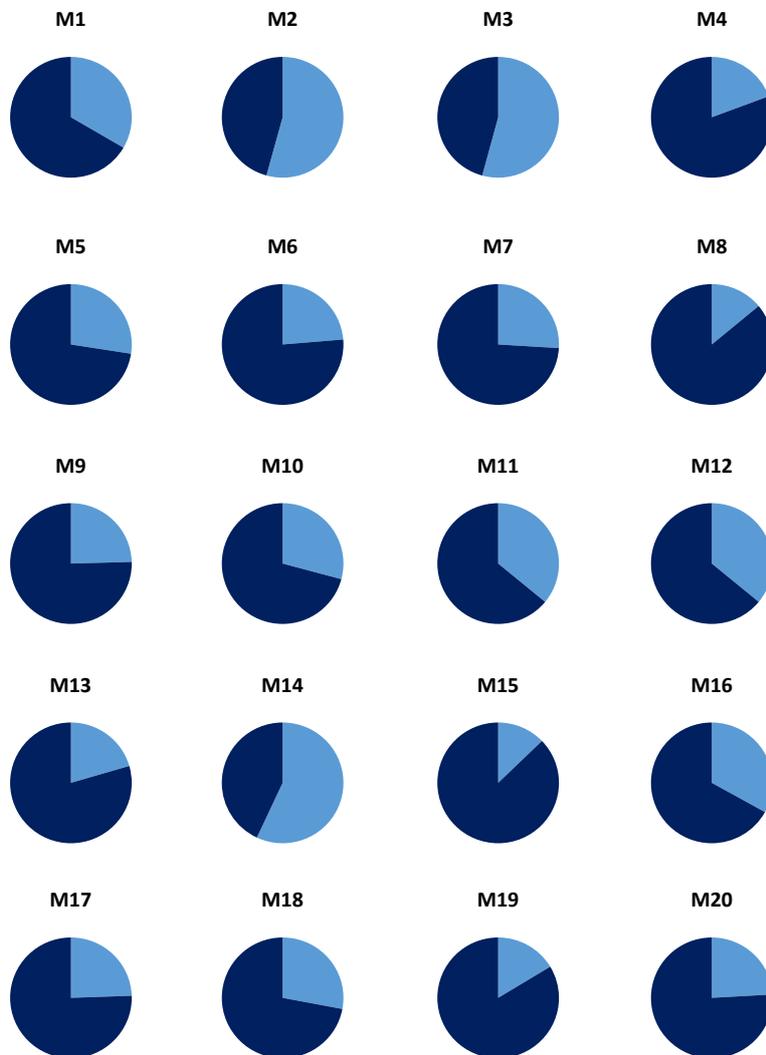


Figura IV.16: Resistencias al bloqueo de poro R_{irrev} (m^{-1}) y Resistencias a la formación de torta R_{rev} (m^{-1}), en las 20 muestras de licor del fango procedentes del MBR urbano

Tal y como se observa en la Figura IV.16, la resistencia a la formación de torta es la principal causa del ensuciamiento prácticamente en todas las muestras, salvo en las muestras M2, M3 y M14 donde ambas resistencias son similares. Este hecho se confirma con los resultados obtenidos por

Resultados y Discusión

Zhang, quien afirma que la resistencia a la formación de torta (R_{rev}) es el principal causante del ensuciamiento de la membrana [22].

En las Figura IV.17 y Figura IV.18, se muestra la evolución de las resistencias reversible e irreversible (R_{rev} y R_{irrev}) frente al flujo de permeado normalizado.

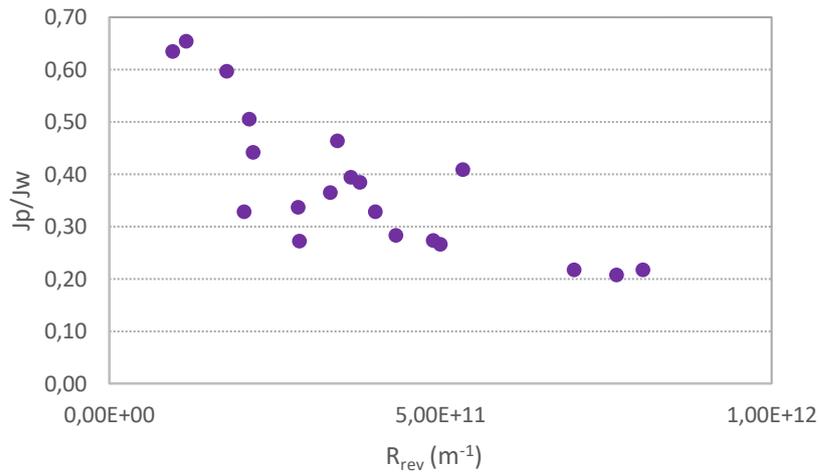


Figura IV.17: Resistencia a la formación de torta R_{rev} (m^{-1}) frente a la densidad de flujo de permeado normalizado

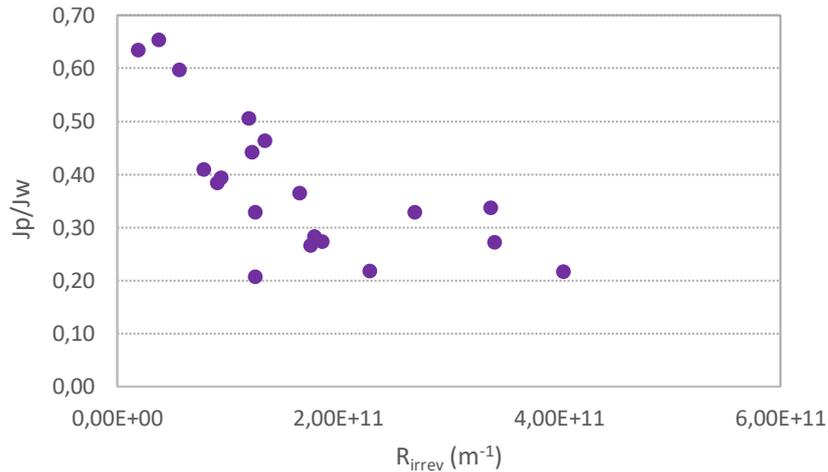


Figura IV.18: Resistencia al bloqueo de poro R_{irrev} (m^{-1}) frente a la densidad de flujo de permeado normalizado

Comparando la influencia de las resistencias reversible e irreversible con la densidad de flujo de permeado, se observa que a medida que las resistencias R_{rev} y R_{irrev} aumentan, la densidad de flujo de permeado que se obtiene es menor, debido a que el ensuciamiento de la membrana es mayor. Esto se confirma con los siguientes coeficientes de Pearson $r_p = -0.7768$ (P-valor = 0.0001) y $r_p = -0.7708$ (P-valor = 0.0001), respectivamente.

3.2.2. Influencia de los SSLM en las resistencias a la filtración

Otro parámetro importante a tener en cuenta es la concentración de sólidos en suspensión en el licor de mezcla. A continuación, se representa en la Figura IV.19.

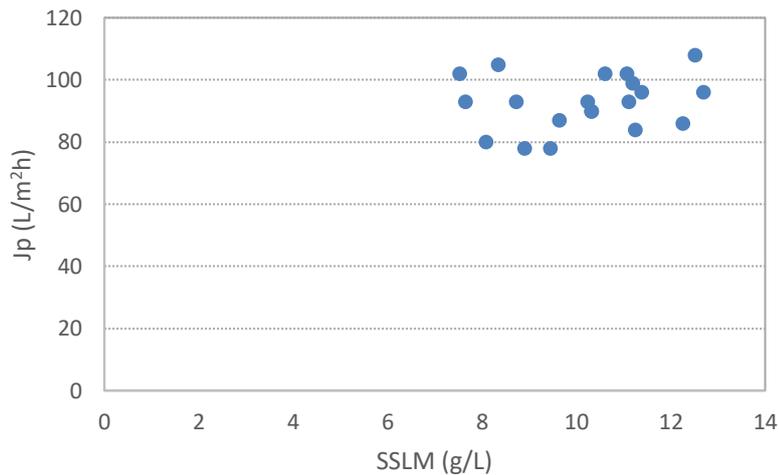


Figura IV.19: Influencia de los sólidos en suspensión del licor de mezcla (SSLM) en la densidad de flujo de permeado

Tal y como se observa en la Figura IV.19, para el rango estudiado de concentración de sólidos en suspensión en el licor de mezcla (8 - 12.5 g/L), no se ha encontrado influencia de los sólidos sobre la densidad de flujo de permeado. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados en bibliografía, que indican que el efecto del aumento de los SSLM sobre la

Resultados y Discusión

permeabilidad de la membrana puede ser positivo, negativo o nulo, principalmente debido a la variabilidad que presentan las muestras de licor de mezcla.

Aparentemente, la concentración de sólidos en el licor de mezcla, debería ser un parámetro relacionado con el ensuciamiento de las membranas. Sin embargo, la relación entre la concentración de sólidos y la tendencia al ensuciamiento es bastante compleja [14]. Li et al. (2008) obtuvieron resultados contradictorios con otros autores sobre el efecto de los SSLM en el ensuciamiento de la membrana [24], mientras los resultados de Meng et al. (2006) muestran que el ensuciamiento aumenta con el incremento de la concentración de sólidos en el licor de mezcla [23], Li et al. (2008) sugieren que el incremento de SSLM contribuye a disminuir el ensuciamiento de la membrana [24]. Estos resultados contradictorios, en cuanto a la existencia de una óptima concentración del licor de mezcla y el ensuciamiento, son confirmados por Van den Broeck et al. (2011) [25].

En las Figura IV.20 y Figura IV.21 se muestra la influencia de los SSLM con las resistencias R_{rev} y R_{irrev} , respectivamente.

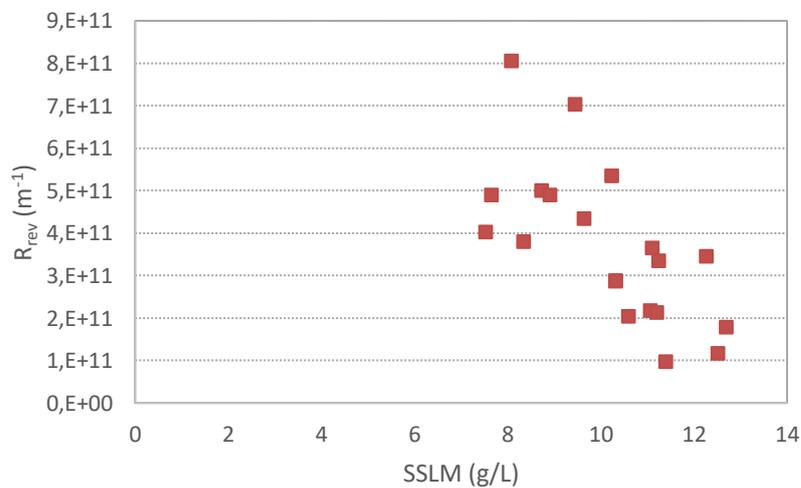


Figura IV.20: Influencia de los sólidos en suspensión en el licor de mezcla (SSLM) con la resistencia reversible

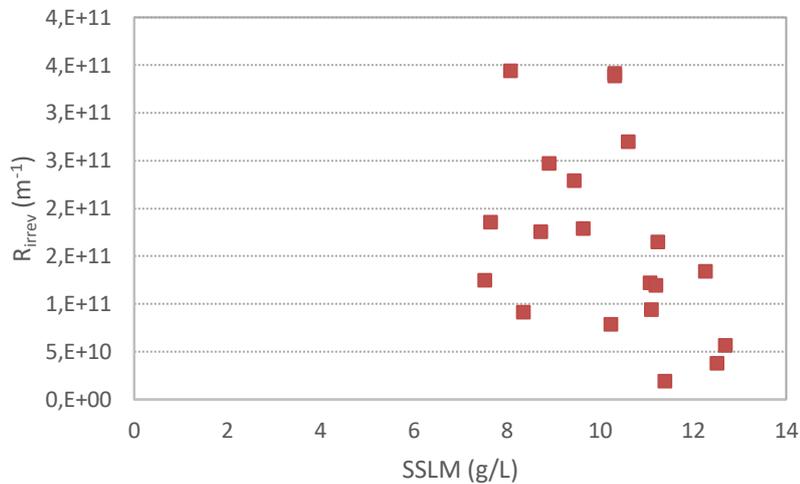


Figura IV.21: Influencia de los sólidos en suspensión en el licor de mezcla (SSLM) con la resistencia irreversible

Al igual que sucede para la densidad de flujo de permeado, no se ha encontrado influencia para el rango estudiado de concentración de sólidos (8 - 12.5 g/L), entre los SSLM y la resistencia a la formación de torta (R_{rev}) y la resistencia al ensuciamiento (R_{irrev}), y por tanto debida a la resistencia total (R_t).

Meng et al. [26] (2007) realizaron un estudio en un MBR a escala de laboratorio aumentando la concentración de SSLM de 2 a 20 g/L. Obtuvieron que la influencia de los SSLM en la resistencia al ensuciamiento debida al bloqueo de poro y la formación de torta, aumentaba exponencialmente con el incremento de la concentración de SSLM, empezándose a observar dicha influencia a partir de una concentración crítica de 10 g/L.

Durante el proceso de filtración, pequeñas moléculas y partículas del licor de mezcla penetran en los poros de la membrana, quedando retenidos sobre la misma. A medida que la concentración de SSLM aumenta, aumenta el número de partículas en el fango activo, así como el de coloides y

Resultados y Discusión

macromoléculas, que producen un aumento más severo del ensuciamiento de la membrana [26].

3.2.3. Influencia de la viscosidad en las resistencias a la filtración

En la Figura IV.22 y Figura IV.23 se muestra la influencia de la viscosidad del licor de mezcla frente a la resistencia total y el flujo de permeado, respectivamente.

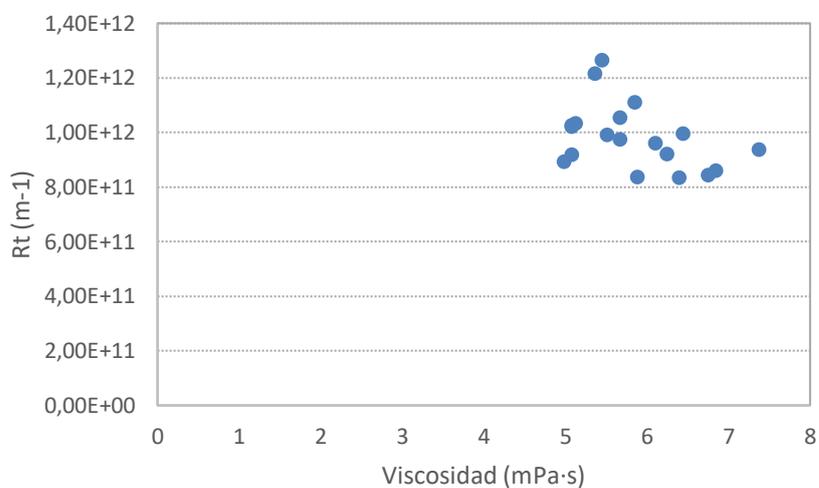


Figura IV.22: Influencia de la viscosidad (a 354 s^{-1}) en la resistencia total al ensuciamiento

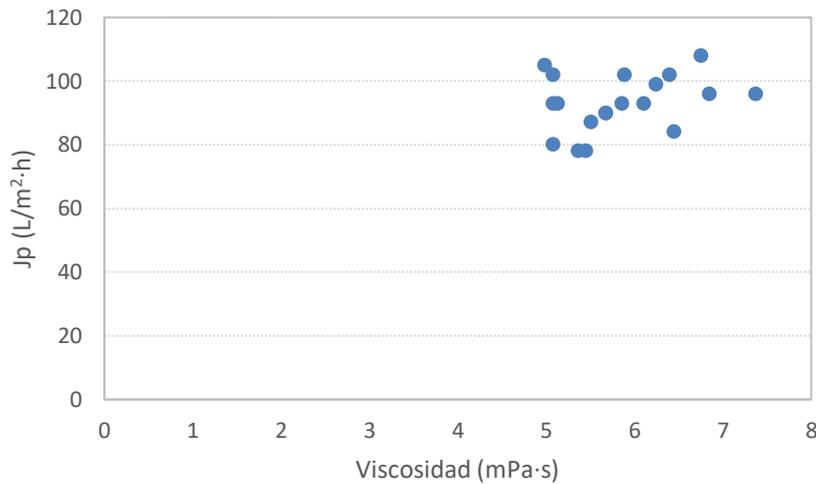


Figura IV.23: Influencia de la viscosidad ($\gamma = 354 \text{ s}^{-1}$) en la densidad de flujo de permeado

Tal y como se observa en las Figura IV.22 y Figura IV.23, para la concentración de sólidos estudiada, no existe relación entre la viscosidad del licor de mezcla y la resistencia total y la densidad de flujo de permeado. Cabe esperar que si la concentración de SSLM hubiera sido mayor, la viscosidad sí que hubiera afectado al ensuciamiento de la membrana y por tanto a la permeabilidad de la misma. Meng et al. (2007) demostraron que existe una concentración de SSLM crítica (8-12 g/L) a partir de la cual la viscosidad del fango aumenta considerablemente y por tanto su influencia en la resistencia al ensuciamiento de la membrana [26]. A medida que aumenta la concentración de sólidos en el licor de mezcla y la viscosidad, se acumulan más biopolímeros y partículas en la superficie de la membrana, aumentando el ensuciamiento de la misma [26].

3.2.4. Influencia de los SMP y eEPS en las resistencias a la filtración

Tal y como se ha comentado en la introducción los productos solubles microbianos (SMP) y las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) son los principales constituyentes de los biofilms, flóculos y fango

Resultados y Discusión

activo. Es por ello, que existen un gran número de investigaciones en torno a la influencia de los SMP y eEPS en el ensuciamiento de las membranas.

Los SMP constituyen el material celular soluble que se libera durante la lisis celular y, están compuestos principalmente por proteínas y carbohidratos. En la Figura IV.24 y Figura IV.25 se muestra la influencia de los SMP_{proteínas} en las resistencias R_{rev} y R_{irrev} , respectivamente.

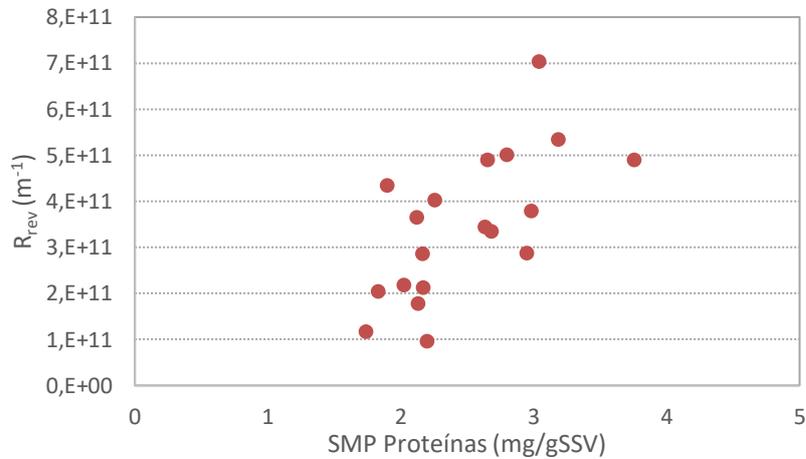


Figura IV.24: Influencia de las proteínas de los compuestos solubles microbianos en la resistencia a la formación de torta (R_{rev})

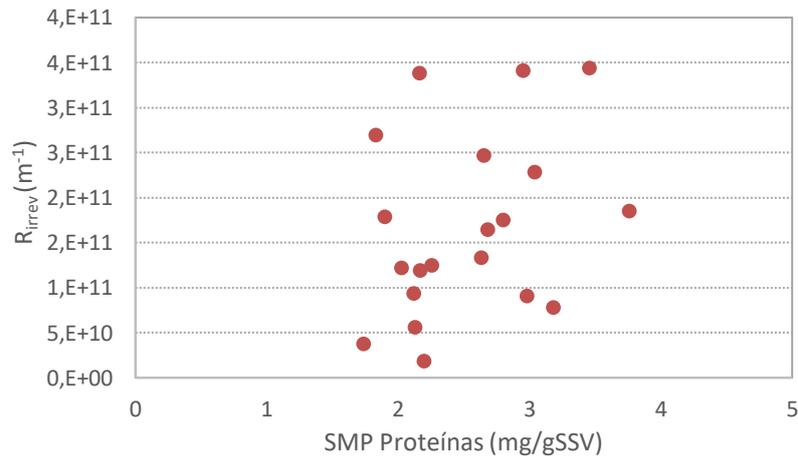


Figura IV.25: Influencia de las proteínas de los compuestos solubles microbianos en la resistencia al bloqueo de poro

A la vista de los resultados obtenidos se observa que, en nuestro caso particular, las proteínas contenidas en los compuestos solubles microbianos influyen principalmente en la resistencia R_{rev} , ($r_p = 7285$, P-valor = 0.0004). En cambio con la resistencia R_{irrev} no se observa relación. Esto es debido probablemente a la elevada velocidad a la que se forma la torta sobre la membrana, la cual hace que los SMP queden absorbidos en la misma en lugar de penetrar hacia los poros de la membrana. Como se ha comentado anteriormente, la formación de torta es el principal causante del ensuciamiento de la membrana [21,22].

Comparando con resultados bibliográficos, Li et al. (2008) obtuvieron que los SMP no presentaban correlaciones significativas con el ensuciamiento de la membrana [24]. Por otro lado, Cosenza et al. (2013) también expusieron que el bajo valor de resistencias obtenido en relación con la concentración de SMP en el licor de mezcla era debido a la baja concentración de SMP [27]. Sin embargo, en bibliografía se encuentran resultados contradictorios, por ejemplo, Meng et al. (2006) sí obtuvieron una correlación positiva entre los SMP y las resistencias a la filtración, cabe destacar que la concentración de SMP en el licor de mezcla en su estudio era mayor (50-150 mg/L) [23]. En nuestro estudio la concentración de SMP es baja (32.5 ± 12 mg/L), por lo que su influencia en el ensuciamiento no es muy significativa, además provoca una dispersión en los resultados elevada.

La Figura IV.26 representa la influencia de la concentración de proteínas, contenidas en los SMP, en la densidad de flujo de permeado normalizado. Se puede observar que, a medida que la concentración de proteínas en los SMP es mayor, el valor de la densidad de permeado normalizado disminuye. Esto es debido a que los SMP contribuyen al ensuciamiento de la membrana ($r_p = -0.5460$, P-valor = 0.0156). Este resultado concuerda con el obtenido por Zhang, quien sugiere que los SMP tienen una influencia negativa en la permeabilidad del licor de mezcla [22].

Los resultados obtenidos por Reid et al. (2008) muestran que no encontraron correlación entre los SMP, con la resistencia de la torta ni con la densidad de flujo de permeado de la membrana [28].

Resultados y Discusión

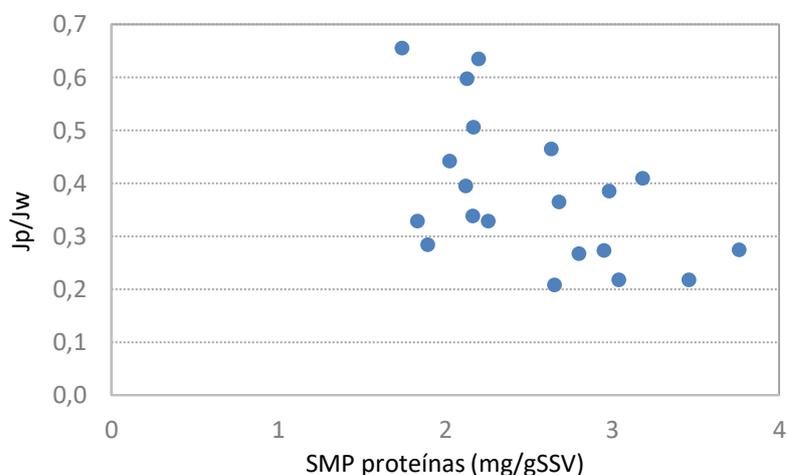


Figura IV.26: Influencia de las proteínas de los compuestos solubles microbianos en el flujo de permeado normalizado

Cabe comentar que en este apartado únicamente se muestran los resultados obtenidos con las $SMP_{\text{proteínas}}$ que, como se ha comentado anteriormente, son los compuestos mayoritarios en los SMP. Además, no se ha encontrado relación entre los $SMP_{\text{carbohidratos}}$ y las resistencias.

Al igual que en el presente trabajo, Drews et al. (2008) concluyeron que no existe correlación entre la concentración de carbohidratos en los SMP y el ensuciamiento de la membrana. Esto puede ser debido a la baja concentración de carbohidratos encontrada ($11.5 \pm 8 \text{ mg}_{\text{Glucosa}}/\text{L}$) [29].

En cuanto a la influencia de la concentración de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) en el ensuciamiento de la membrana, en la Figura IV.27, Figura IV.28, Figura IV.29 y Figura IV.30, se representa la influencia de las eEPS, extraídas con el método CER (2 etapas) y con el método Triton X-100, en las resistencias a la formación de torta (R_{rev}) y al bloqueo de poro (R_{irrev}).

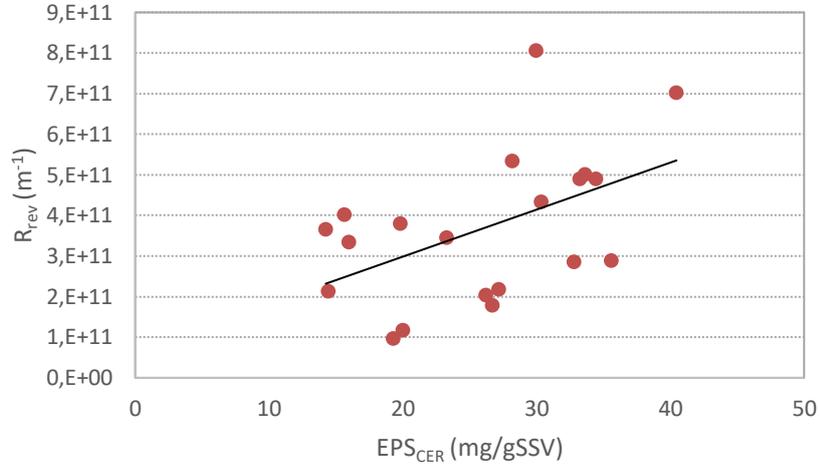


Figura IV.27: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con el método CER en la resistencia a la formación de torta

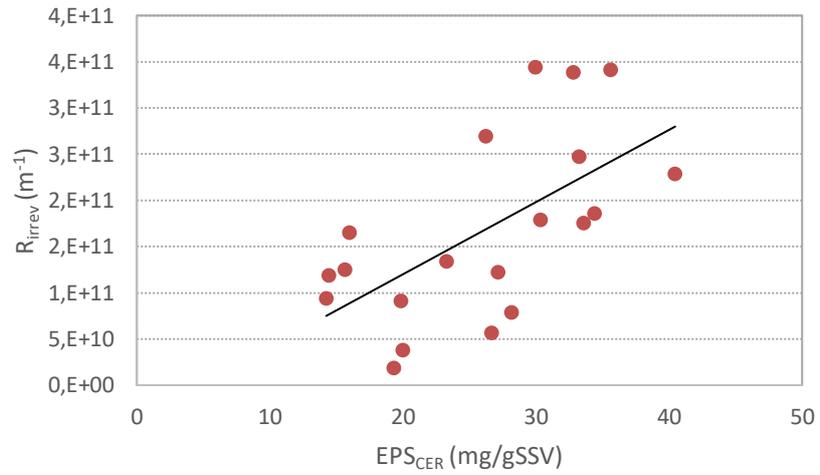


Figura IV.28: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con el método CER en la resistencia al bloqueo de poro

Resultados y Discusión

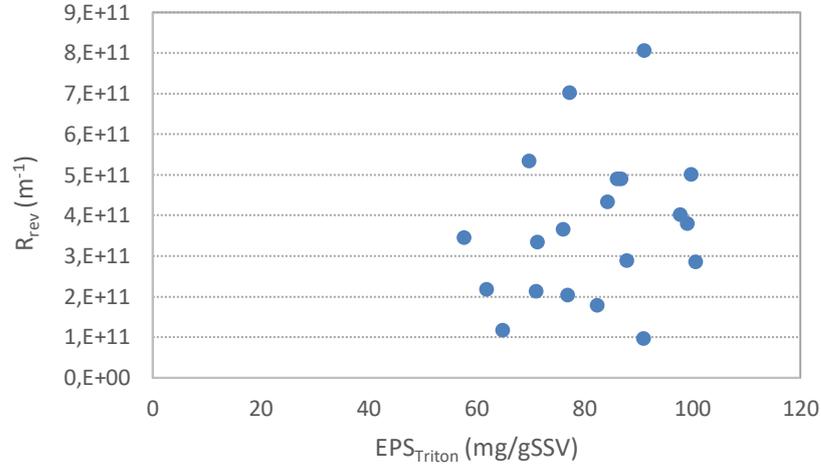


Figura IV.29: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con el método Triton X-100 en la resistencia a la formación de torta

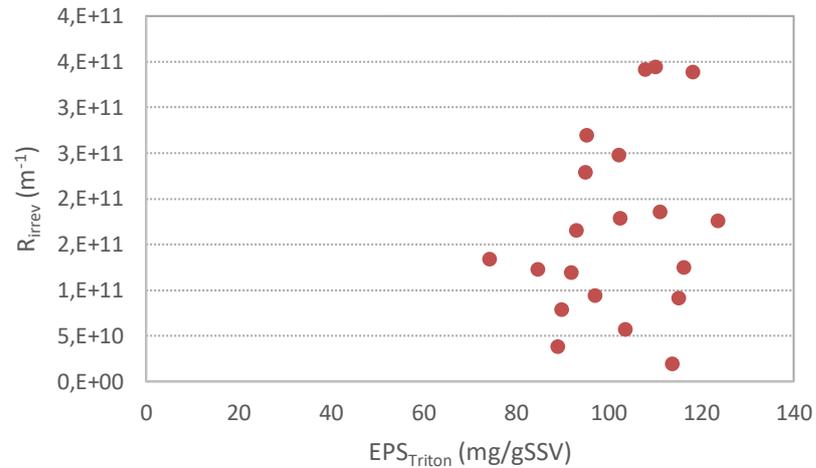


Figura IV.30: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con el método Triton X-100 en la resistencia al bloqueo de poro

Tal y como se observa en las figuras anteriores, con el método CER se observa una ligera tendencia al aumento del ensuciamiento, tanto reversible ($r_p = 0.4930$, P-valor = 0.0320) como irreversible ($r_p = 0.6126$, P-

valor = 0.0053), con el aumento de la concentración de EPS. Estos resultados concuerdan por los obtenidos por Li et al. (2008) [24].

Comparando los resultados obtenidos con ambos métodos de extracción de EPS, si asumimos que el ensuciamiento de la membrana aumenta con la concentración de EPS, el método que mejores resultados ofrece es el método CER, ya que se describe mejor la filtrabilidad del licor de mezcla que el método Triton. Esto es debido a que las EPS obtenidas con el método Triton a pesar de ser mayores que las obtenidas con el método CER, no producen mayor ensuciamiento de la membrana (ni para R_{rev} ni R_{irrev}), esto justifica que el método Triton es más agresivo que el método CER y por tanto, durante la extracción se libera material intracelular. Es decir, este material intracelular no contribuye al ensuciamiento de la membrana ya que no está en contacto con ella.

En la Figura IV.31 se muestra la influencia de las eEPS, tanto extraídas con CER como con Triton X-100, con el flujo de permeado normalizado.

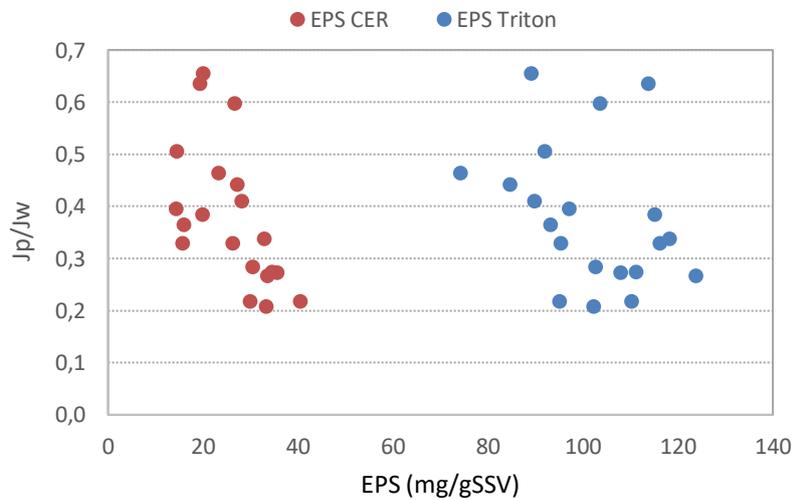


Figura IV.31: Influencia de las sustancias poliméricas extracelulares extraídas (eEPS) con los métodos CER y Triton X-100, en la densidad de flujo de flujo de permeado

Resultados y Discusión

Tal y como se observa en la Figura IV.31 no se observa una relación significativa entre las sustancias poliméricas extracelulares extraídas con los métodos CER y Triton con la densidad de flujo de permeado normalizado.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Reid et al. (2008), quienes además de encontrar que las proteínas eran los principales componentes tanto en los SMP como en los EPS, no encontraron correlación entre los EPS con la permeabilidad de la membrana [28].

3.3. TIEMPO DE SUCCIÓN CAPILAR

El tiempo de succión capilar (TSC) es un parámetro ampliamente utilizado para evaluar la deshidratación del fango activo. Un valor elevado del TSC implica una baja filtrabilidad y, como consecuencia, una deshidratación reducida del fango [30].

En la Figura IV.32 se muestra la medida del TSC en las 20 muestras en las que se caracterizaron los parámetros físicos del licor de mezcla procedente del MBR_urbano. Se muestra el TSC tanto para tubo con diámetro de 10 mm como para tubo con diámetro de 18 mm.

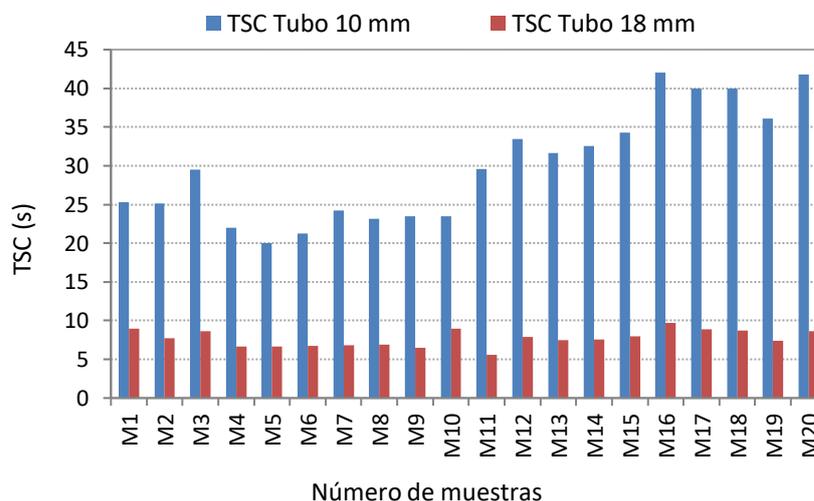


Figura IV.32: Tiempo de succión capilar medido con tubo largo y corto en las 20 muestras del MBR urbano

Tal y como se muestra en la Figura IV.32, el TSC con el tubo con diámetro de 18 mm se mantiene constante a lo largo de todas las experiencias. En cuanto al tubo con diámetro de 10 mm se observa que aumenta a partir de la muestra 11, lo que coincide también con un aumento en la concentración de sólidos (por encima de los 10 g/L), por tanto, es más difícil filtrar el fango. La relación encontrada con el TSC medido con tubo con diámetro de 10 mm es mayor debido a que es más adecuado para el rango de sólidos estudiado. El diámetro de 18 mm se debe utilizar para concentraciones superiores.

En la Tabla IV.6 se muestran los 5 rangos de SSLM estudiados, la concentración de SSLM promedio obtenida en dichos rangos, el ratio SSVLM/SSLM, el TSC (medido con el tubo con diámetro de 10 mm), el TSC normalizado (calculado dividiendo el TSC por la concentración de SSLM) y la viscosidad promedio en dichos rangos.

Tabla IV.6: Resultados del TSC, TSC normalizado y viscosidad en función del rango de la concentración de biomasa (n=20)

Rango SSLM (g/L)	SSLM (g/L)	SSVLM/SSLM	TSC (S)	TSC normalizado (s·L/g)	η (mPa·s)
7.5-8.5	7.90 ± 0.38	0.73	22.14 ± 2.25	2.80	4.63 ± 0.55
8.5-9.5	9.17 ± 0.39	0.72	23.31 ± 1.14	2.54	5.40 ± 0.06
9.5-10.5	10.06 ± 0.37	0.73	27.61 ± 7.64	2.74	5.69 ± 0.19
10.5-11.5	11.10 ± 0.27	0.72	34.23 ± 4.40	3.08	6.32 ± 0.33
11.5-12.5	12.49 ± 0.22	0.74	40.55 ± 1.05	3.25	7.06 ± 0.44

Se observa que, a medida que la concentración de sólidos va incrementándose, el tiempo de succión capilar y la viscosidad del fango también lo hacen, de modo que el fango es menos filtrable. El valor del TSC normalizado muestra una tendencia inversa, disminuyendo a medida que aumenta la concentración de SSLM.

Resultados y Discusión

Cabe destacar que las condiciones del ensayo del TSC son muy diferentes de las condiciones de filtración real de una membrana, donde existe un flujo cruzado que puede reducir la deposición de partículas sobre la membrana, por lo que este ensayo sólo nos puede facilitar un conocimiento aproximado de la filtrabilidad.

En la Tabla IV.7 se muestra el coeficiente de correlación de Pearson (con su respectivo P-valor), el cual indica si existe relación lineal entre dos variables cuantitativas. En concreto, se recogen las correlaciones lineales entre el tiempo de succión capilar (medido con tubo con diámetro de 10 mm) con los SSLM, la viscosidad y los SMP (carbohidratos). En este caso no se ha encontrado correlación con las proteínas.

Tabla IV.7: Coeficientes de correlación de Pearson (r_p) y P-valores para correlaciones lineales entre el TSC y otras propiedades del fango activo

	r_p	P-valor
SSLM (g/L)	0.7284	0.0004
Viscosidad (η)	0.6667	0.0018
SMP-carbohidratos	0.5418	0.0166

Se observa que el TSC está correlacionado con la concentración de SSLM, es decir, a mayor concentración de SSLM más difícil se deshidrata el fango y, por tanto, mayor es el TSC. Según Ng et al. (2006) un elevado TSC indica un alto contenido en agua adherida a la biomasa que dificulta la filtración del licor de mezcla [31].

Ng et al. (2006) también concluyeron que el tiempo de succión capilar normalizado era un indicador del ensuciamiento de la membrana [31]. Sin embargo, en la presente tesis, no se ha encontrado una relación significativa entre ambos parámetros. Jin et al. (2010) en su estudio obtuvieron resultados similares a los expuestos [32], es decir, la relación entre el ensuciamiento de la membrana y el TSC normalizado fue insignificante, no siendo éste un parámetro indicador del ensuciamiento de la membrana en las condiciones estudiadas.

En la Figura IV.33 se representa la influencia de la viscosidad en el TSC. Se observa que, tal y como se indicaba en la Tabla IV.6, a medida que aumenta la viscosidad del licor de mezcla aumenta el TSC, haciendo que éste sea menos filtrable.

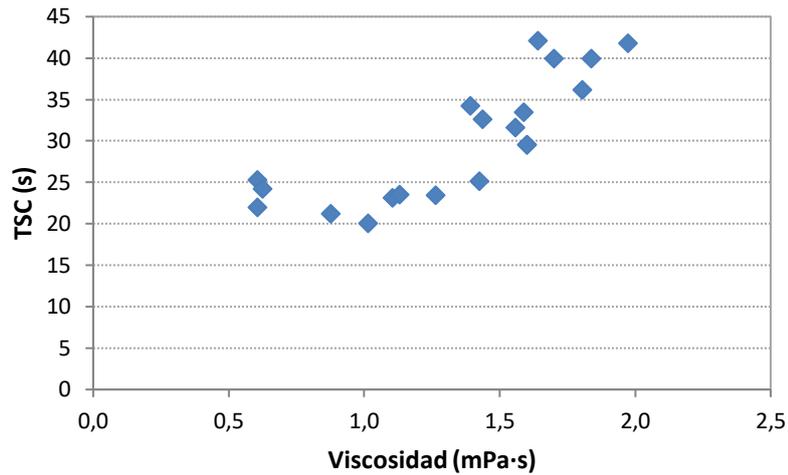


Figura IV.33: Influencia de la viscosidad de las muestras de licor de mezcla en el tiempo de succión capilar

En cuanto a la relación entre el TSC y los productos solubles microbianos (SMP), en la bibliografía se han encontrado resultados contradictorios. Mientras que Lousada et al. (2015) indican que no encontraron relación lineal entre la filtrabilidad del fango y los SMP [33], Ruhsing et al. (2010) afirman que el TSC está altamente relacionado con los productos solubles microbianos y el ensuciamiento de la membrana, especialmente los polisacáridos contenidos en los SMP [34]. Reid et al. (2008) también encontraron una ligera relación entre el TSC y la fracción de carbohidratos contenida en los SMP [28]. Generalmente, se cree que la naturaleza hidrofílica de los SMPc (carbohidratos) junto con el tamaño de partícula subcoloidal que tienen (1000 a 10.000 Da [35]), promueve el taponamiento de los poros, así como también la formación de geles “pegajosos” sobre la superficie de la membrana [36].

3.4. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS

La distribución del tamaño de partículas (DTP) del licor de mezcla ayuda a predecir el ensuciamiento de la membrana, ya que las partículas que tienen un tamaño similar o igual al del tamaño del poro de la membrana pueden provocar un ensuciamiento severo de la misma. Esta medida se realiza con la técnica de difracción láser y se expresa en volumen.

En la Figura IV.34 se observa la evolución de la distribución del tamaño de partículas de las muestras de licor de mezcla seleccionadas a modo de ejemplo (1, 5, 10, 15 y 20).

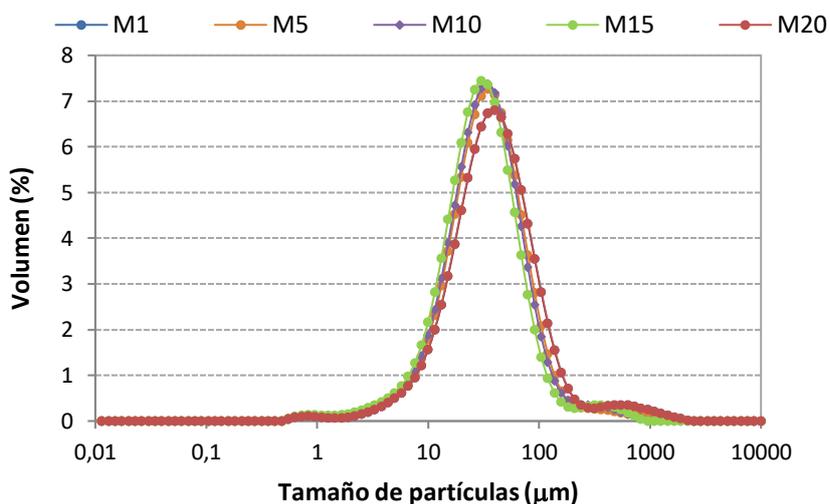


Figura IV.34: Distribución del tamaño de partículas de las muestras de licor de mezcla 1, 5, 10, 15 y 20

A continuación, en la Tabla IV.8 se muestran los resultados del diámetro medio en volumen ($D_{[4,3]}$) y los percentiles 10, 50 y 90, expresado en μm , de las 20 muestras de licor de mezcla.

Tabla IV.8: Diámetro medio en volumen y percentiles (μm) en las 20 muestra de licor de mezcla

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
D [4,3]	55.228	56.253	58.008	59.275	55.252	43.26	51.594	37.001	49.529	47.793
d (0,1)	11.052	11.803	11.467	11.136	10.965	10.431	10.455	10.41	10.604	10.279
d (0,5)	33.408	35.68	33.978	32.838	32.198	29.615	29.808	29.625	29.937	29.535
d (0,9)	90.13	98.27	93.012	93.757	87.959	76.115	78.807	72.81	80.185	77.427
	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20
D [4,3]	44.108	42.555	48.802	43.385	45.007	42.02	42.121	N/A	42.928	39.512
d (0,1)	9.548	9.653	9.499	9.306	9.375	8.896	9.299	N/A	9.01	8.937
d (0,5)	27.36	27.431	27.549	26.838	27.595	25.991	27.008	N/A	26.727	26.452
d (0,9)	72.617	70.872	73.33	70.673	75.859	68.593	71.481	N/A	66.18	68.742

N/A: no analizada

Resultados y Discusión

Tal y como se observa en la Figura IV.34 y en la Tabla IV.8 las muestras presentan poca variabilidad entre ellas. Se puede decir que el diámetro medio en volumen de las 20 muestras de fango es alrededor de 47,5 μm . Un 10% de las partículas tienen un tamaño en volumen inferior a 10 micras, un 50% tienen un volumen inferior a 29 micras y el 90% es inferior a 78 micras.

Pese a que Reid et al. (2008) no obtuvieron ninguna correlación evidente entre el tamaño de partículas y otros de los parámetros medidos (TSC, viscosidad, SSLM, SMP y eEPS) [28], en esta tesis doctoral sí que se ha encontrado una correlación entre este parámetro y el ensuciamiento de la membrana, medido a través de las resistencias a la filtración. En la Tabla IV.9 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson y P-valores significativos entre la distribución del tamaño de partículas y otras propiedades medidas en el fango activo.

Tabla IV.9: Coeficientes de correlación de Pearson (r_p) y P-valores para correlaciones lineales entre el DTP y otras propiedades del fango activo

	r_p	P-valor
R_{rev}	0.5311	0.0160
R_{irrev}	0.5447	0.0130
R_t	0.4794	0.0324
TSC(tubo \varnothing 10 mm)	-0.5640	0.0096
Viscosidad (η)	-0.6491	0.0026
CER eEPSp	0.4495	0.0468
SMP-P	0.4998	0.0248
Triton eEPSp	0.5515	0.0117

Se ha obtenido una correlación positiva entre las resistencias R_{rev} , R_{irrev} y R_t . En cuanto a las resistencias R_{rev} y R_t se demuestra que, a medida que las partículas del fango son de mayor tamaño, la torta formada sobre la membrana es mayor y, como consecuencia, la resistencia ofrecida. Cabe

destacar que otros autores como Meng et al. (2006) obtuvieron una correlación negativa en el caso de la resistencia al ensuciamiento R_{irrev} [23]. La diferencia respecto al dato obtenido en la presente Tesis, es debida al modo de determinar la R_{irrev} , ya que es posible que tras aclarar la membrana con agua no se hubiera eliminado toda la torta formada durante el proceso de filtración, sino una parte de la misma y esta torta residual influya en la determinación de la R_{irrev} .

En cuanto al tiempo de succión capilar y la viscosidad, se ha obtenido una correlación negativa con el tamaño de partícula.

Tal y como se muestra en la Tabla IV.9, existe correlación entre distribución del tamaño de partículas y las proteínas tanto de las SMP como de las eEPS. En cambio no la hay con los carbohidratos tanto de los SMP como de las eEPS (datos no mostrados). Esto es debido a que las proteínas son de mayor tamaño molecular. Bourven et al. (2015) tras medir mediante cromatografía de exclusión las EPS extraídas de un fango activo, observaron que las proteínas tenían un tamaño superior a 10kDa (entre 10 y 1000 kDa), mientras que los carbohidratos tenían un tamaño inferior a 10 kDa [37]. Garnier et al. (2005) obtuvieron valores similares al caracterizar las EPS de diferentes fangos, en cuanto al peso molecular de las proteínas varió entre 10 y 600 kDa y el de los polisacáridos fue inferior a 1 kDa.

4. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DEL LICOR DE MEZCLA

4.1. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DEL LICOR DE MEZCLA CON MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES

Las muestras de licor de mezcla del MBR fueron examinadas con un microscopio óptico Olympus BX50 con contraste de fases, determinándose la forma de los flóculos y la presencia de protozoos y metazoos en la biomasa, lo cual aporta información sobre el estado del proceso de depuración.

En las Figura IV.35 - Figura IV.40 se observan algunas fotografías del licor de mezcla procedente del MBR urbano. A partir de las mismas se pueden deducir las características principales del fango. Como se observa, los flóculos son más pequeños que en un proceso de fangos activos convencional, lo cual es debido a la turbulencia generada por la aireación, utilizada para la limpieza de las membranas del MBR. Los flóculos tienen una estructura abierta y compacta. Se observa también la presencia de microorganismos característicos de edades del fango elevadas, como son los rotíferos y anélidos.

También existe una elevada abundancia de bacterias filamentosas, lo cual no presenta un problema en el proceso MBR, ya que no hay etapa de sedimentación posterior, porque la membrana ejerce de barrera entre la biomasa y el agua tratada.

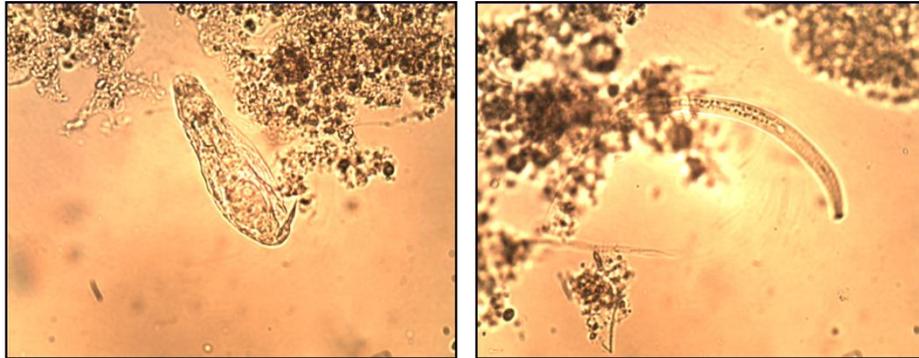


Figura IV.35: Metazoos presentes en el licor de mezcla, rotífero (a) y nematodo (b) (400x)

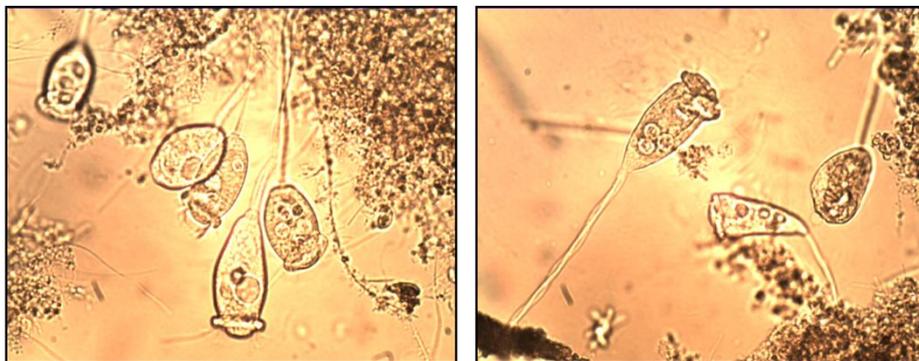


Figura IV.36: Protozoos presentes en el licor de mezcla, vorticelas (400x)

En la Figura IV.37 y Figura IV.38 se observa la estructura del flóculo a diferentes aumentos, 200x y 400x respectivamente. Como se ha comentado, se observa la presencia de bacterias filamentosas.

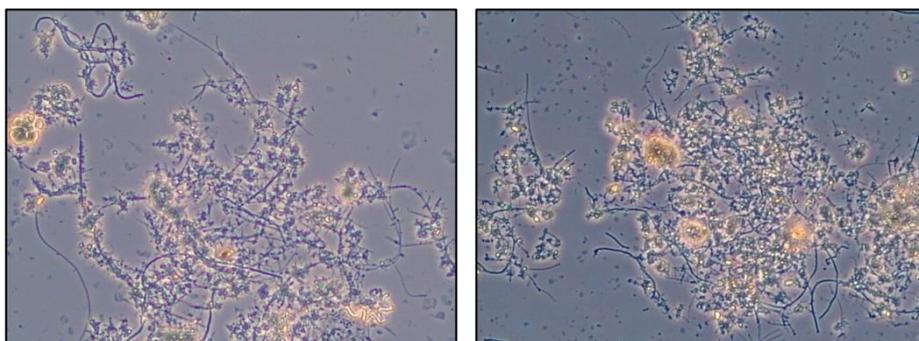


Figura IV.37: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas del licor de mezcla (200x)

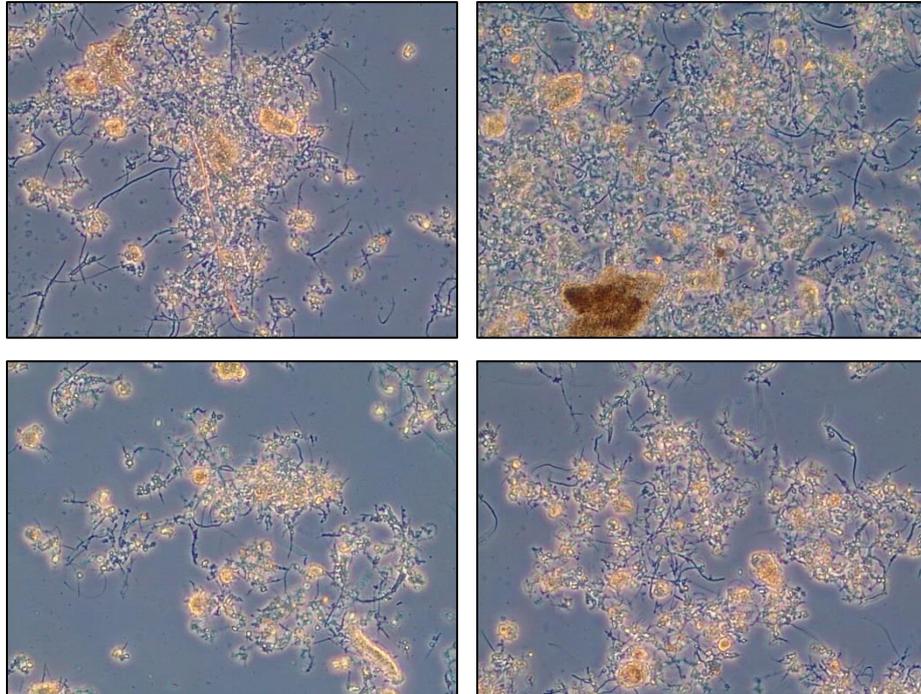


Figura IV.38: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas del licor de mezcla MBR urbano (100x)

En los MBR industriales también se tomaron fotografías de los flóculos de ambos licores de mezcla. A continuación, en la Figura IV.39 se muestra el aspecto del fango procedente del MBR industrial con bajo contenido en sólidos en el lixiviado, el MBR-LS.

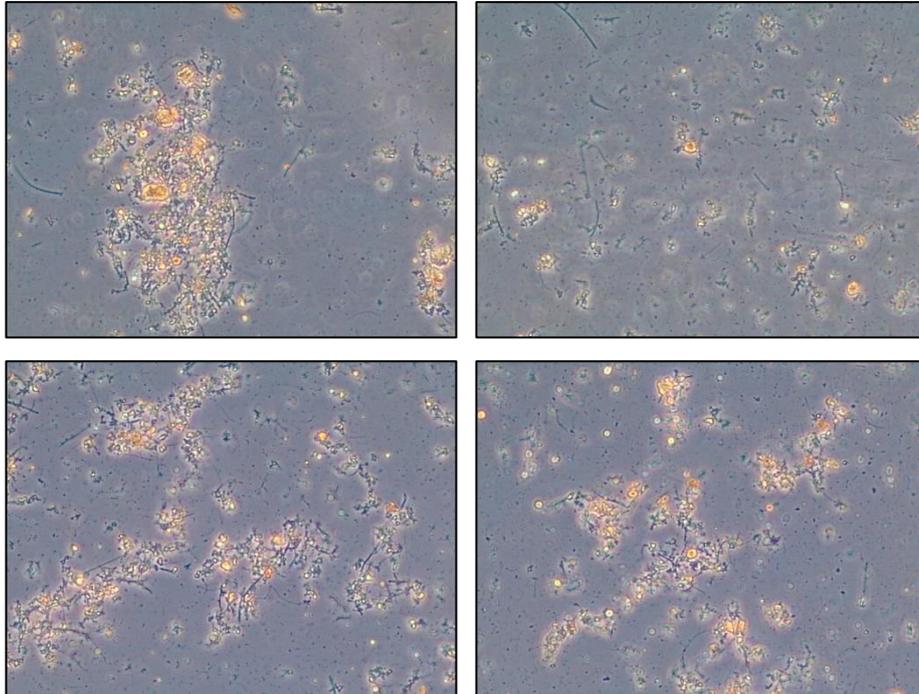


Figura IV.39: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas del licor de mezcla MBR-LS (100x)

En la Figura IV.40 se muestra el fango procedente del MBR industrial con alto contenido en sólidos en el afluente, el MBR-HS.

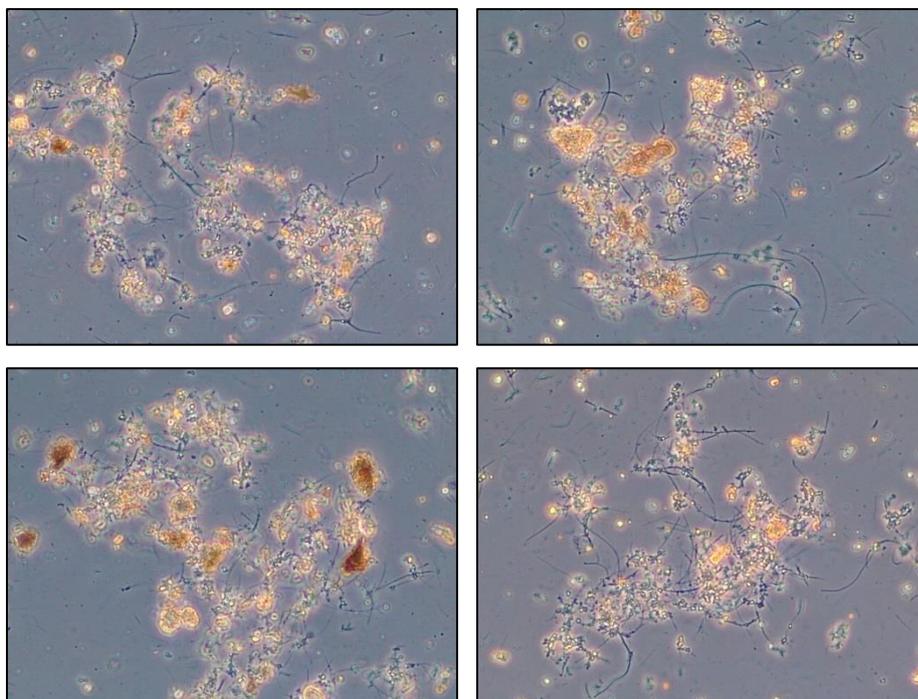


Figura IV.40: Estructura del flóculo y bacterias filamentosas del licor de mezcla MBR-HS (100x)

Tal y como se observa en la Figura IV.39 y Figura IV.40, el fango procedente de ambos MBR industriales, MBR-LS y MBR-HS, está muy disgregado y la diversidad y abundancia de protozoos es escasa. Este hecho es debido a la elevada salinidad y las características físico-químicas del lixiviado, que originan un flóculo tipo punta de alfiler, es decir, poco compacto y con escasa presencia de bacterias filamentosas.

4.2. VIABILIDAD CELULAR

Otro parámetro de tipo biológico que se puede determinar con microscopía de epifluorescencia es la viabilidad celular, a partir de la integridad de la membrana. En la Figura IV.41 se muestra un ejemplo de 6 imágenes de un total de 20 imágenes tomadas en la muestra 10 para el MBR urbano.

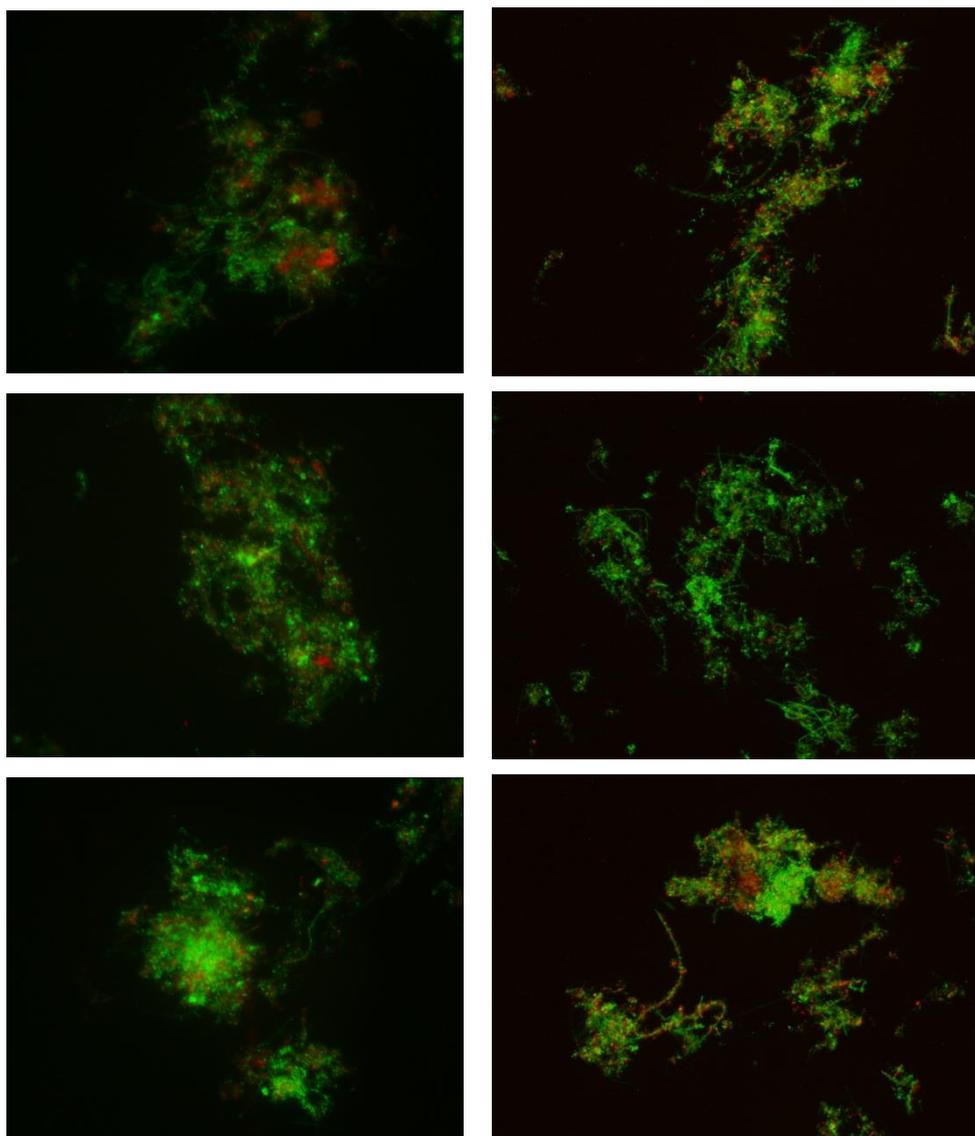


Figura IV.41: Imágenes de viabilidad celular para la muestra 10 del MBR urbano

Resultados y Discusión

Tal y como se observa, la gran mayoría de células se tiñen de verde, lo que indica cualitativamente que la mayor parte de la biomasa es viable. No se encontró diferencia significativa entre las 20 muestras. En la Tabla IV.10 se muestra el resultado obtenido tras procesar las imágenes con el software BiolumageL™v2.1 para obtener numéricamente el porcentaje de células viables.

Tabla IV.10: Porcentajes de células viables (verdes), dañadas (rojas) y otros (NS), determinados con el software BiolumageL™v2.1

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
% Verdes	78.5	96.8	95.4	93.6	94.5	98.5	96.4	97.8	96.3	86.3
% Rojas	14.5	2.6	4.4	5.9	4.8	1.5	3.5	1.1	3.5	13.7
% NS	7.0	0.6	0.2	0.5	0.7	0.1	0.1	1.1	0.2	0.1
	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20
% Verdes	86.4	95.2	94.4	97.3	87.6	91.6	78.1	82.8	97.2	93.0
% Rojas	13.5	4.8	5.5	2.7	10.6	8.3	21.9	17.1	2.8	6.9
% NS	0.1	0.03	0.08	0.01	1.8	0.03	0.04	0.03	0.06	0.03

Tal y como se observa en la Tabla IV.10 y Figura IV.42, la gran mayoría de las células presentes en el licor de mezcla del MBR son viables, concretamente el 92% de las células.

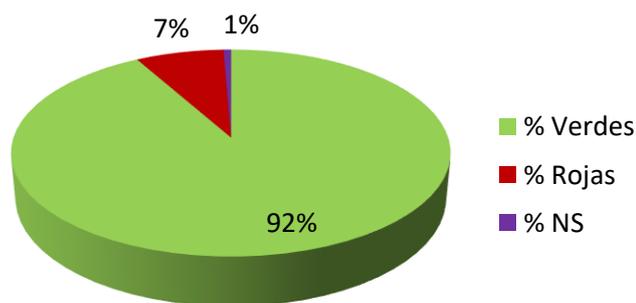


Figura IV.42: Valores promedios de células viables (verdes), dañadas (rojas) y otros (violeta) para el MBR urbano

4.3. CARACTERIZACIÓN DE EPS MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

La microscopía de epifluorescencia se plantea como una técnica que permite la determinación de la estructura y composición de las eEPS, mediante la tinción de diferentes componentes del flóculo con fluorocromos específicos. De este modo, es posible visualizar diferentes componentes por separado, como son las proteínas, los carbohidratos o el ADN.

Sin embargo, no existe un protocolo estandarizado para la preparación de las muestras. Por ello, en la presente tesis se partió de los resultados obtenidos por Nosyk et al. (2008), quienes compararon siete métodos de pretratamiento de la muestra (fijación e inmovilización) para teñir simultáneamente diferentes componentes de los flóculos, de modo que no se viera alterada la forma y estructura del flóculo [38].

En la Figura IV.43 y la Figura IV.44 se muestran las imágenes de 4 series de fotografías seleccionadas. Cada imagen de estas series corresponde a una de las 20 imágenes tomadas para cada campo (proteína, carbohidrato y ADN), de la Muestra 10 del MBR urbano. La imagen teñida en verde corresponde a las proteínas, la imagen teñida en rojo a los carbohidratos y la teñida en azul a los ácidos nucleicos. La cuarta imagen se obtiene de la superposición de las tres anteriores, y representa composición total de las eEPS según el protocolo de Nosyk.

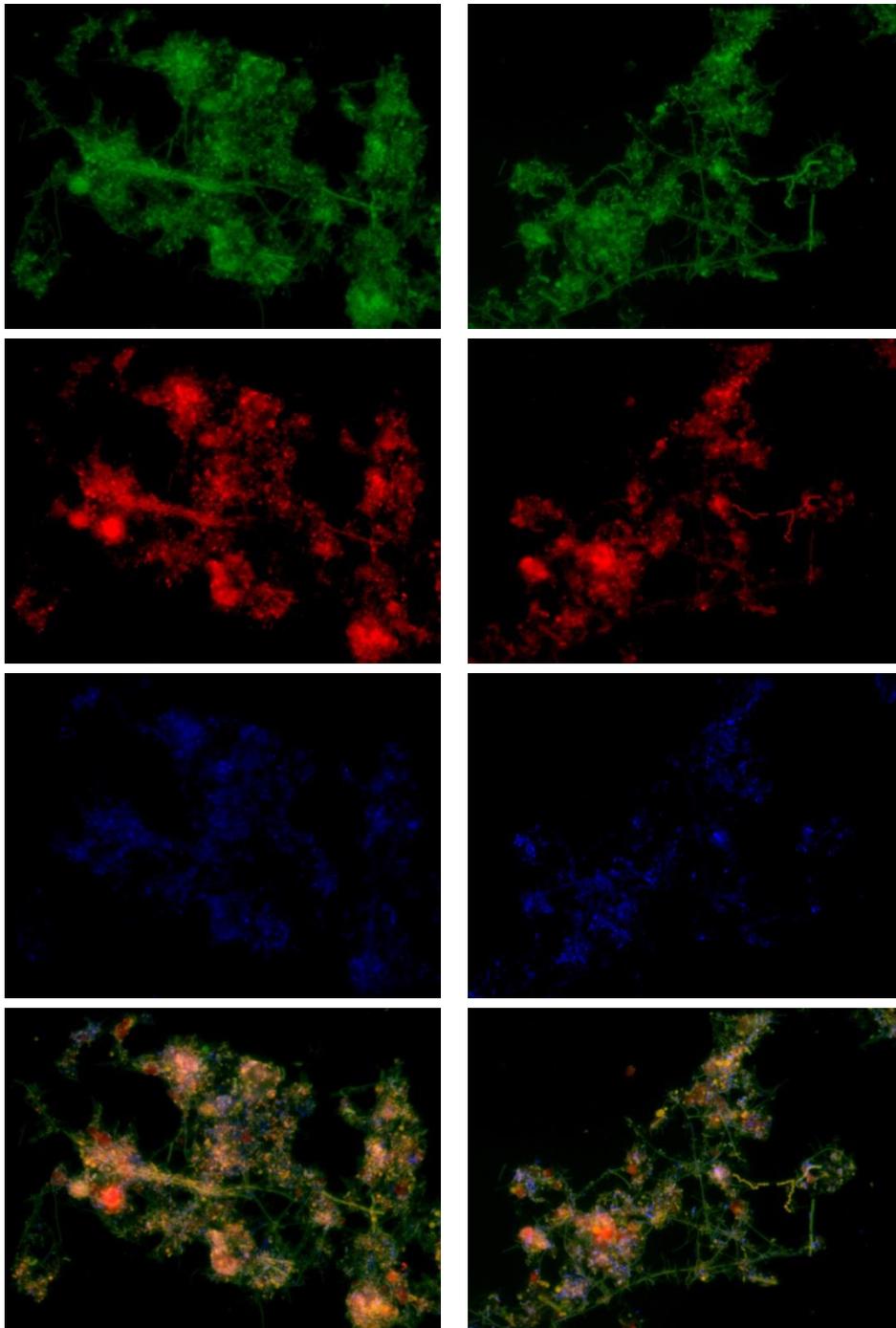


Figura IV.43: Proteínas, carbohidratos, ADN y eEPS totales en la M10 (Nosyk)

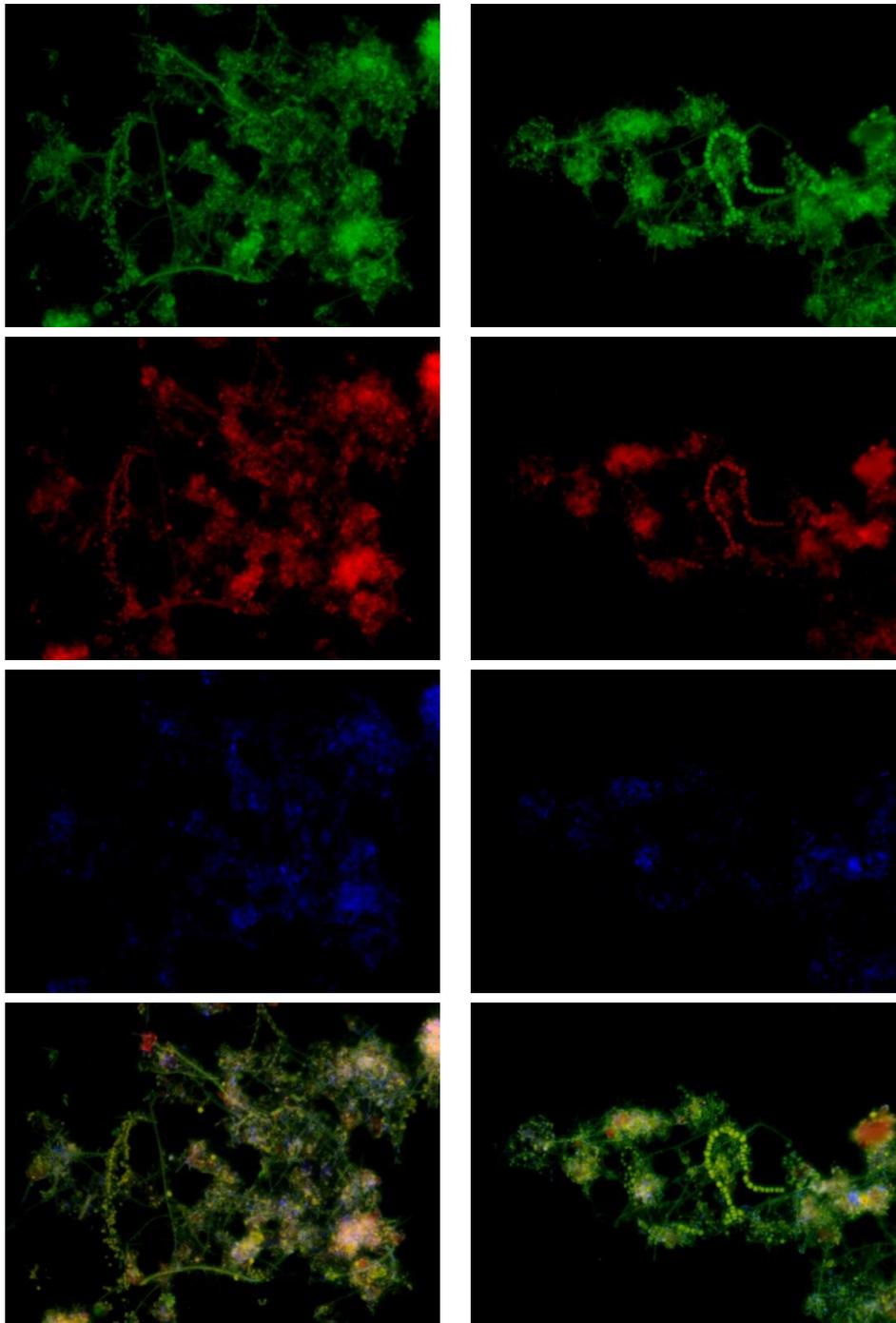


Figura IV.44: Proteínas, carbohidratos, ADN y eEPS totales en la M10 (Nosyk)

Resultados y Discusión

En la Tabla IV.11 se muestran los valores obtenidos tras procesar las imágenes con la rutina desarrollada en Matlab y descrita en la sección 7.2.5 del capítulo de Material y Métodos [39]. En esta tabla se muestra el valor medio, la desviación estándar y la incertidumbre (U) de cada una de las 20 muestras analizadas.

Tabla IV.11: Valores obtenidos de media, desviación estándar e incertidumbre al procesar las imágenes del microscopio de epifluorescencia con la rutina programada en Matlab

	%Proteínas			%Carbohidratos			%ADN		
	Media	SD	U	Media	SD	U	Media	SD	U
M1	83	17.9	3.6	18	12	2.4	16	32.5	5.4
M2	93	8.9	2.6	27	12.3	3.5	25	1.5	0.4
M3	83	17.3	3.7	20	7.9	1.7	17	13.8	3
M4	79	13.7	3.1	26	12.9	2.9	37	7.1	1.6
M5	70	17.2	3.7	35	15.6	3.3	58	20.2	4.2
M6	94	10.6	2.3	36	13.2	2.8	32	9	1.9
M7	86	19.3	4.2	43	15.3	3.3	56	15.4	3.4
M8	67	19.4	4.1	48	16.6	3.5	11	6	1.3
M9	72	11.6	2.4	38	10.4	2.2	20	8.5	1.8
M10	65	12.3	2.6	37	13.4	2.8	29	13.3	2.8
M11	70	15.9	3.4	24	12.8	2.7	31	11.6	2.5
M12	47	24.9	5.3	16	13.9	3	15	8.7	1.9
M13	73	17.5	3.8	29	15.5	3.2	11	6	1.3
M14	78	18	3.8	16	4.7	1	17	10	2.1
M15	88	10.1	2.2	20	8.7	1.9	18	4.2	0.9
M16	70	17.1	3.7	17	7	1.5	10	4.7	1
M17	94	11.4	2.5	52	18.5	4	24	12.7	2.8
M18	95	1.9	1.9	47	12.1	2.6	15	3.8	0.8
M19	94	9.8	2.1	42	17.9	3.9	25	10.1	2.2
M20	93	11.4	2.6	38	11.4	2.6	13	6.1	1.4

Tal y como se observa en la Tabla IV.11 las proteínas son el mayor componente de las eEPS, seguido de los carbohidratos. Este es el mismo comportamiento que se ha observado anteriormente en los análisis químicos de las eEPS.

Sin embargo, el ratio proteína/carbohidrato es inferior al obtenido con los análisis químicos. Mientras que con la caracterización óptica se obtiene un P/C ratio de 2.9, en el caso de la caracterización química de estas mismas 20 muestras (serie 2, descrita en la sección 2 del capítulo de Material y Métodos) este ratio es de 4.8, 4 y 8.4, para las extracciones realizadas con Triton X-100, CER en 2 etapas y CER en 1 etapa, respectivamente. Como ya se ha comentado anteriormente cada método de extracción extrae una concentración diferente de eEPS, pero con todos ellos se obtiene una ratio P/C superior.

La diferencia entre los ratios P/C obtenidos en los análisis microscópicos y los químicos puede ser debida a los diferentes mecanismos empleados por ambos métodos analíticos. Mientras que el método BCA mide aquellas proteínas que se miden a través de la reacción de Biuret, con el método óptico se observa el resultado de la suma de las diferentes proteínas teñidas. En cuanto a la concentración de carbohidratos medida, tanto con el método de Dubois como en el de la Antrona, están referidos al contenido en glucosa. En cambio, con el TRITC-Con A (que es un fluorocromo a base de lectina), se logra visualizar glucosa y manosa y sus derivados ramificados, tales como α -glucanos (dextrano), glucógeno, amilopectina, α -mananos y otros carbohidratos tales como levano, xantano y ácido hialurónico [38].

Por tanto, los diferentes ratios P/C entre los métodos ópticos y químicos, pueden ser explicados por la diferente composición de las proteínas y carbohidratos detectados con cada procedimiento de análisis [38].

Adicionalmente, con el fin de comparar el protocolo anterior con el descrito por Sun et al. (2008) [40], se realizó la tinción de proteínas, carbohidratos y ADN, para las mismas 20 muestras, con los fluorocromos indicados por éste. En la Figura IV.45 se muestran las imágenes de 2 series de fotografías. Cada imagen de estas series corresponde a una de las 20 imágenes tomadas para cada campo (proteína, carbohidrato y ADN), de la Muestra 10 del MBR urbano. La imagen teñida en naranja corresponde a las proteínas, la imagen teñida en rojo a los carbohidratos y la teñida en verde a los ácidos nucleicos. La cuarta imagen se obtiene de la superposición de las anteriores.

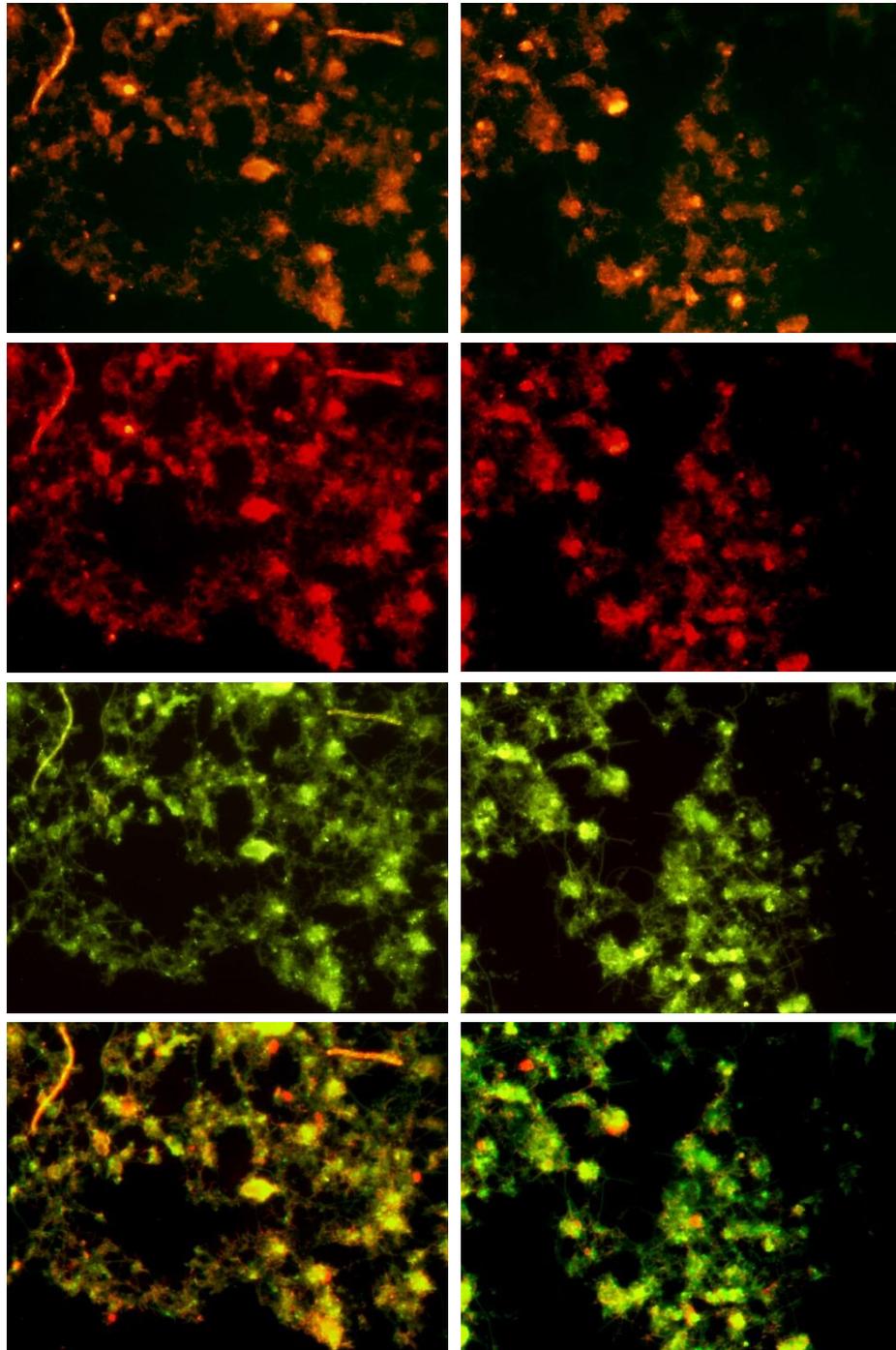


Figura IV.45: Proteínas, carbohidratos, ADN y eEPS totales en la M10 (Sun)

Las imágenes obtenidas con el método de Sun fueron de peor calidad. Se trató de mejorar la calidad de las mismas modificando el tampón utilizado y su concentración pero apenas se logró mejora. Este hecho dificultó la medida de la concentración de proteínas teñidas con el fluorocromo Nanoorange.

Cabe comentar que los métodos empleados de Nosyk y Sun tiñen todos los ácidos nucleicos. Existen otros fluorocromos que tiñen exclusivamente el ADN extracelular como el DDAO (7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona). Este fluorocromo es capaz de teñir el ADN extracelular debido a su peso molecular, el cual no les permite penetrar a través de la membrana celular si ésta está intacta [41]. Se hizo una prueba con un microscopio confocal láser que tenía el láser que permitía trabajar con este fluorocromo, dado que para la excitación del DDAO se requería el uso de un filtro que no se disponía en el microscopio de epifluorescencia. Dada la complejidad de la técnica finalmente se analizó el ADN total.

5. MBR INDUSTRIAL

En este apartado se recogen los resultados de la caracterización de muestras de licor de mezcla procedentes de dos MBR industriales, los cuales tratan el agua residual generada en dos plantas de tratamiento de la Fracción Orgánica de Residuos Sólidos Urbanos (FORSU). Dicha agua residual procede de la mezcla de la fracción líquida, separada por centrifugación, de la FORSU tras su digestión anaerobia y del lixiviado generado en las pilas de compostaje, donde se composte la fracción sólida de la FORSU digerida. En cada planta la etapa de digestión anaerobia se realiza de una manera: en vía húmeda y en vía seca.

Por ello, y tal y como se ha comentado en el punto 5.2 del Capítulo III, los MBR se abrevian como MBR-HS (efluente procedente de la digestión anaerobia en vía seca y compostaje) y MBR-LS (efluente procedente de la digestión anaerobia en vía húmeda y compostaje).

En este apartado se incluye también la caracterización del agua residual que se trata en cada MBR para buscar relaciones entre la caracterización del fango y las características de la corriente de entrada a los MBR.

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL

En la Tabla IV.12 se muestra la caracterización del agua residual de entrada (afluente) a cada uno de los MBR. De cada parámetro se muestra el valor promedio de las 6 medidas y análisis realizados junto con su desviación estándar.

Tabla IV.12: Caracterización del agua residual afluyente a los MBR industriales

	MBR-LS	MBR-HS
pH	7.99 ± 0.10	7.99 ± 0.10
Conductividad (mS/cm)	16.26 ± 6.97	40.13 ± 4.65
SS (mg/L)	4401 ± 1812	12940 ± 1301
DQO (mg/L)	9430 ± 5944	32910 ± 7106
DQOs (mg/L)	3140 ± 1262	20927 ± 7635
NT (mg/L)	1879 ± 990	6267 ± 2666
NTs (mg/L)	790 ± 320	4890 ± 406
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	767 ± 324	3990 ± 410

Tal y como se muestra en la Tabla IV.12, ambas aguas residuales tienen características distintas, a excepción del pH. El influente del MBR-HS tiene una concentración de sólidos aproximadamente tres veces superior a la del MBR-LS, lo que se debe claramente al tipo de proceso de digestión anaerobia que se lleva a cabo. Como se ha comentado en el MBR-HS se realiza por vía seca y en el MBR-LS por vía húmeda.

La diferencia de proceso también afecta a los valores de la DQO y NT, siendo superiores en el caso del efluente procedente de la vía seca. En concreto, la DQO y el NT son 3,5 y 3,3 veces más altas en el afluyente del MBR-HS que en el afluyente del MBR-LS. Sin embargo, se mantuvo casi el mismo ratio entre ambos parámetros.

En cuanto a la conductividad, cabe destacar que los valores fueron mucho mayores en el influente del MBR-HS que en el influente del MBR-LS, mostrando las muestras del MBR-HS valores menos variables.

En comparación con los resultados observados en bibliografía sobre plantas de tratamiento de lixiviados, las características del agua residual (lixiviado) obtenidas en el MBR-LS son similares a las de otras plantas. Sin embargo, las concentraciones de sólidos en el MBR-LS fueron mayores. En cuanto al MBR-HS, las concentraciones de todos los parámetros medidos

fueron mayores que las encontradas en bibliografía (referenciados en la Introducción, Tabla I.4) para plantas de tratamiento de lixiviados de vertederos.

En términos generales, se puede afirmar que las elevadas concentraciones de sólidos y de materia orgánica (DQO) presentes en el efluente de las plantas de tratamiento FORSU hacen necesario un tratamiento con un proceso biológico con altas concentraciones de biomasa, de ahí que el MBR sea un proceso adecuado. Por otro lado se requieren altos tiempos de retención hidráulico, especialmente en el caso del lixiviado procedente de la planta con alto contenido de sólidos en la digestión anaeróbica (MBR-HS).

5.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL LICOR DE MEZCLA

5.2.1. *Productos solubles microbianos (SMP) y sustancias poliméricas extracelulares (eEPS)*

En la Figura IV.46 se muestran las concentraciones de proteínas y carbohidratos presentes en los SMP del licor de mezcla de ambos MBR. En primer lugar, cabe destacar que la concentración de SMP en ambos MBR es muy superior a la que se encuentra en un MBR que trata aguas residuales urbanas, como es el caso del MBR urbano estudiado anteriormente, donde la concentración promedio de proteínas y carbohidratos era de 22.9 ± 7 mgBSA/L y 15.7 ± 13 mgGlucosa/L, respectivamente.

Se observa que el valor de los SMP medido (tanto proteínas como carbohidratos) es mayor en el MBR-HS que en el MBR-LS. Este hecho puede deberse principalmente al mayor estrés de la biomasa presente en el MBR-HS, causado por la acumulación de sólidos no biodegradables [42] y por la alta salinidad ($40,13 \pm 4,65$ mS/cm) [43] que puede conducir al estrés bacteriano. Específicamente, Di Bella et al. (2013) obtuvieron

principalmente una mayor concentración de SMP carbohidratos al aumentar la conductividad del agua residual de 4.34 a 16.95 mS/cm [44].

Los valores de SMP aumentaron considerablemente a partir de la segunda muestra, lo que coincide con un incremento del porcentaje de sólidos volátiles en el MBR-HS. En la muestra 1, la biomasa en el MBR-HS estaba considerablemente mineralizada (con un 57.92% de SSVLM). Este hecho puede explicar la menor concentración de SMP. Además, algunas bacterias en ausencia de alimentos degradables o en condiciones de estrés, son capaces de utilizar el material celular residual como alimento, es decir, los SMPp y SMPc, tal y como se justificará más adelante.

Cuando se purga el fango de los reactores biológicos la carga orgánica aumenta y los microorganismos tienen más alimento disponible, por lo que no necesitan degradar los SMP. Además, el mayor contenido en alimento hace que se reproduzcan más y, como consecuencia, aumente el porcentaje de los sólidos volátiles (Tabla IV.13).

Resultados y Discusión

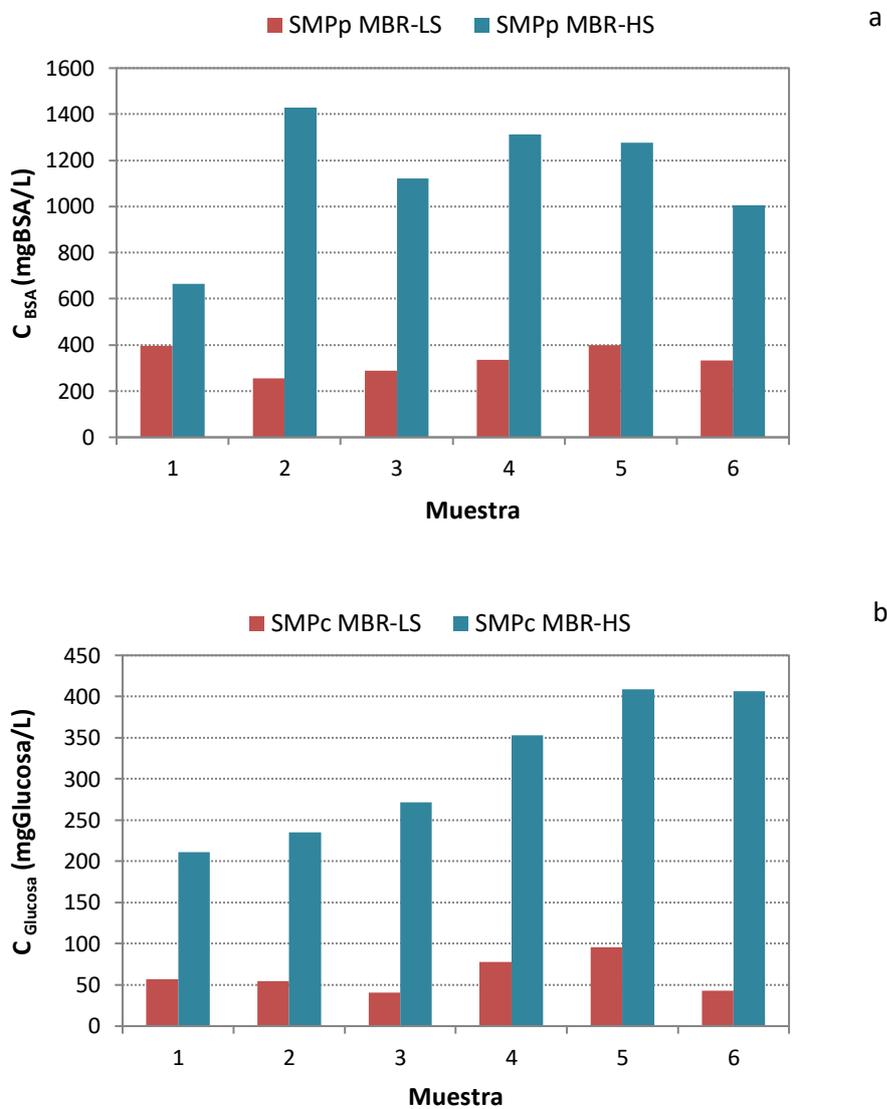


Figura IV.46: Concentración de proteínas (a) y carbohidratos (b) en los SMP del licor de mezcla del MBR-HS y MBR-LS

Comparando las concentraciones de SMP obtenidas en la presente Tesis con las determinadas por otros autores para MBR que tratan lixiviados de vertederos, como Sanguanpak et al. (2015), cabe decir que estos autores

obtuvieron concentraciones menores de SMP que las obtenidas en el MBR-LS [45]. De hecho, las concentraciones de SMPp medidas en el MBR-LS son alrededor de dos veces mayores que las obtenidas por estos autores. En el caso de los SMPc la relación fue muy similar.

De la Figura IV.46 (a) y (b) cabe destacar que la diferencia de concentración entre proteínas y carbohidratos es muy alta, obteniéndose valores promedios de proteínas de 334 ± 57 y 1135 ± 270 mgBSA/gSSV, para el MBR-LS y MBR-HS respectivamente. Y valores de carbohidratos de 61 ± 21 y 314 ± 86 mgGlucosa/gSSV, para el MBR-LS y MBR-HS respectivamente. Sabia et al. (2013) concluyeron que la relación SMPp/SMPc aumentaba bruscamente con la edad del fango. Así, la concentración de SMPc fue mayor que la concentración de SMPp en el caso de edades del fango bajas, mientras que para edades del fango altas la relación SMPp/SMPc alcanzó valores entre 5 y 10 [46]. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en el MBR-LS y MBR-HS, ya que tanto el tiempo de retención hidráulico como la edad del fango son altos para poder lograr el rendimiento de eliminación de DQO requerido.

El mecanismo que puede provocar este comportamiento podría estar relacionado con la aparición de microorganismos que degradan en mayor medida los carbohidratos procedentes de desechos celulares, como es el caso de las bacterias filamentosas pertenecientes al *phylum* de *Bacteroidetes*. Específicamente, las filamentosas *Haliscomenobacter* las cuales están especializadas en la degradación de azúcares [47]. Por lo tanto, estas bacterias son capaces de degradar los carbohidratos, aumentando así la relación entre la concentración de proteínas y carbohidratos. En la Figura IV.47 se muestran imágenes de esta bacteria filamentosa en el fango activo analizado.

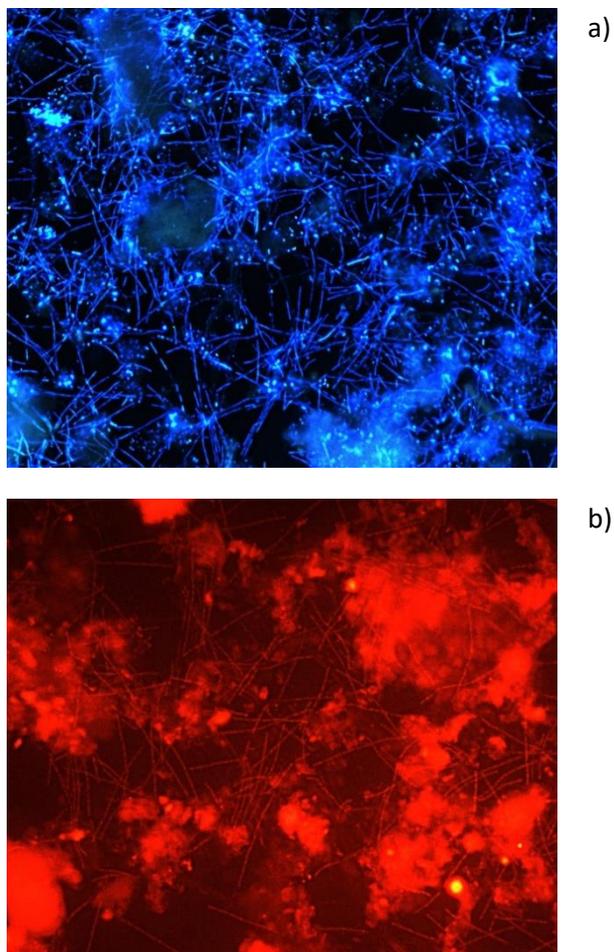


Figura IV.47: (a) Filamentos con apariencia de aguja similar a la tinción de Haliscomenobacter. con DAPI. (b) Filamentos de Haliscomenobacter identificados con la sonda SAP-309 usando la técnica FISH (S3, MBR-HS) [48]

Tal y como se observa en la Figura IV.47, la presencia de bacterias filamentosas pertenecientes al *phylum* Bacteroidetes es muy alta, siendo *Haliscomenobacter* la bacteria predominante.

A continuación, se muestra la concentración de proteínas (eEPSp) y carbohidratos (eEPSc) presente en las eEPS extraídas del licor de mezcla de ambos MBR con los métodos CER en 2 y 1 etapa (Figura IV.48 y Figura IV.49) y el método Triton X-100 (Figura IV.50).

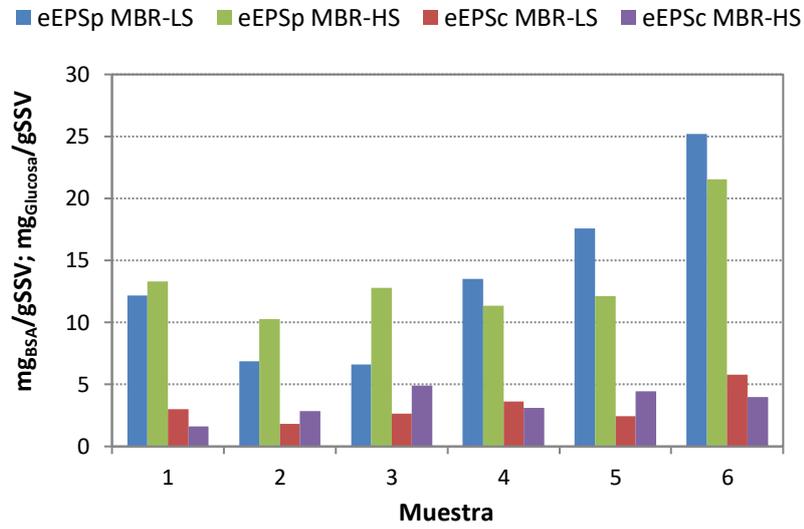


Figura IV.48: Concentración de proteínas (eEPSp) y carbohidratos (eEPSc) en las EPS extraídas del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS (método CER 2 etapas)

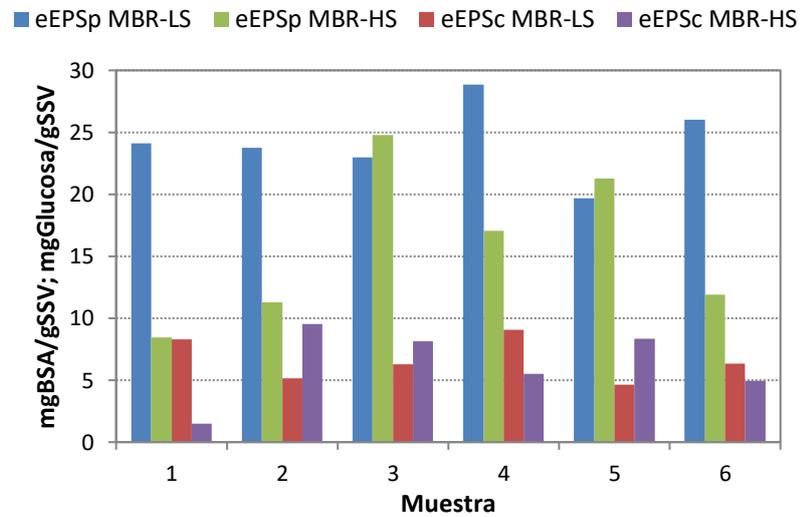


Figura IV.49: Concentración de proteínas (eEPSp) y carbohidratos (eEPSc) en las EPS extraídas del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS (método CER 1 etapa)

Resultados y Discusión

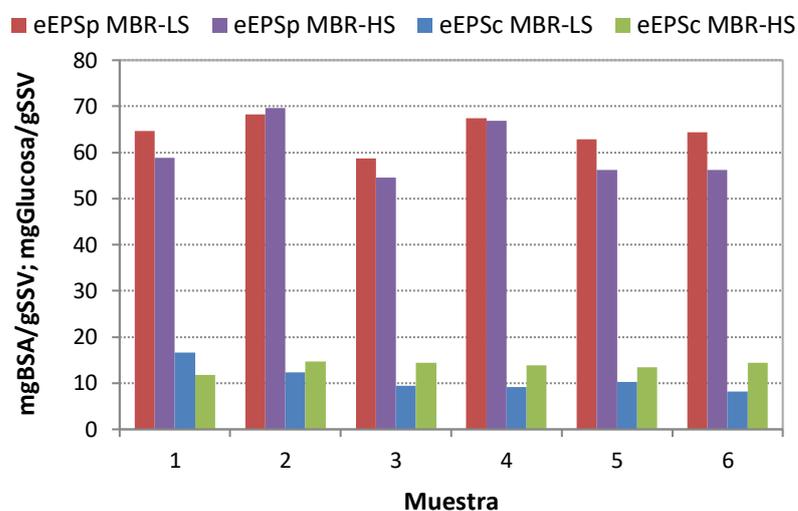


Figura IV.50: Concentración de proteínas (eEPSp) y carbohidratos (eEPSc) en las EPS extraídas del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS (método Triton X-100)

En primer lugar cabe comentar que, las diferencias significativas encontradas en las concentraciones de los SMP entre el MBR-LS y MBR-HS no se han encontrado en las concentraciones de eEPS, ni para el caso de las extracciones con CER, ni para la extracción con Triton X-100. Los valores de eEPS obtenidos son similares a los del MBR urbano estudiado.

Además, tal y como sucedía en la extracción de eEPS del licor de mezcla del MBR urbano, el método Triton X-100 extrae mayor concentración de eEPS que los métodos CER. Comparado con las concentraciones obtenidas por Sanguanpak et al. (2015), las concentraciones medidas de eEPS extraídas con el método Triton X-100 fueron similares para un licor de mezcla que trata un lixiviado procedente de vertedero [45].

Resumiendo, los licores de mezcla del MBR-LS y MBR-HS se caracterizan por tener altas cantidades de desechos celulares, los cuales son responsables de las altas concentraciones de SMP (especialmente en el MBR-HS). Sin embargo, la comparación desde el punto de vista de los EPS es más complicada, ya que los valores de concentración obtenidos apenas

varían entre ambos MBR y además, se ha de tener en cuenta que en estos MBR existe una fracción de DQO no biodegradable que se contabiliza como SSVLM.

5.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL LICOR DE MEZCLA

5.3.1. SSLM y SSVLM

En la Tabla IV.13 se recoge la concentración de los sólidos en suspensión totales y volátiles determinados en el licor de mezcla para cada muestra y en cada MBR estudiado. Los valores de la concentración de SSLM vienen determinados por las purgas periódicas y por los sólidos que aporta el lixiviado (afluente MBR) y que no son de naturaleza biodegradable.

Tabla IV.13: Concentración de sólidos en suspensión totales y volátiles en las muestras del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS

	MBR-LS			MBR-HS		
	SSLM (g/L)	SSVLM (g/L)	%SSVLM	SSLM (g/L)	SSVLM (g/L)	%SSVLM
1	27.83	18.81	67.57	25.23	14.63	57.92
2	13.06	10.07	77.15	26.59	16.79	63.63
3	17.17	13.13	76.45	20.06	14.63	72.97
4	19.38	15.10	77.90	21.67	16.69	77.02
5	22.53	18.05	80.73	24.14	18.61	77.09
6	23.62	18.68	79.14	20.83	15.50	74.42

Tal y como se observa en la Tabla IV.13, las concentraciones de SSLM han sido variables en el período estudiado, principalmente en el MBR-LS. Los valores oscilaron entre 13.06 y 27.83 g/L para el MBR-LS y entre 20.06 y 26.59 g/L para el MBR-HS.

Estos valores pueden considerarse típicos de una configuración de MBR externo, mientras que un intervalo entre 8 y 18 g/L es el valor típico para una configuración de MBR sumergido [49]. En este caso, es necesaria una alta concentración de sólidos en el licor de mezcla para eliminar la DQO degradable.

Con respecto al porcentaje de sólidos en suspensión volátiles, la Tabla IV.13 muestra que los valores de las muestras 1, 2 y 3 fueron los más bajos. Sin embargo, el porcentaje de SSVLM aumentó cuando los SSLM disminuyeron debido a la purga de lodos realizada. De este modo se alcanzaron valores entre 74 y 80% SSVLM.

5.3.2. Ensayos de ultrafiltración del licor de mezcla. Resistencias a la filtración

En primer lugar, antes de cada ensayo de UF, se midió la permeabilidad de la membrana usando agua destilada como alimentación. El valor medio obtenido de la permeabilidad de la membrana (150 KDa de Microdyn Nadir) fue de 500 L/(m²·h) a 0,3 bar. Con el fin de que todos los ensayos fueran comparables entre sí se descartaron las membranas cuyo valor de permeabilidad obtenido fuera un 15% superior o inferior al valor promedio.

En la Tabla IV.14, se muestran las resistencias a la filtración (total, reversible e irreversible) para cada muestra de licor de mezcla de ambos MBR. La resistencia intrínseca de la membrana se mantuvo en todos los recortes entre 5E+11 m⁻¹ y 9E+11 m⁻¹ y no tiene influencia sobre el ensuciamiento de la membrana.

Tabla IV.14: Resistencias a la filtración obtenidas con el licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS

MBR-LS	1	2	3	4	5	6
R_t (m^{-1})	8.01E+12	1.15E+13	6.50E+12	8.77E+12	6.93E+12	4.04E+12
R_{irrev} (m^{-1})	8.62E+11	5.23E+11	7.94E+11	2.19E+12	1.66E+12	4.12E+11
R_{rev} (m^{-1})	6.35E+12	9.96E+12	4.80E+12	5.79E+12	4.75E+12	2.90E+12
MBR-HS	1	2	3	4	5	6
R_t (m^{-1})	1.97E+13	1.99E+13	1.73E+13	2.16E+13	1.97E+13	1.64E+13
R_{irrev} (m^{-1})	9.86E+11	8.20E+11	1.36E+12	9.72E+11	6.31E+11	1.93E+11
R_{rev} (m^{-1})	1.80E+13	1.84E+13	1.51E+13	2.01E+13	1.82E+13	1.53E+13

Tal y como se observa en la Tabla IV.14, en las muestras procedentes del MBR-HS se obtiene una R_t mayor que en las del MBR-LS. Este hecho está de acuerdo con los resultados mostrados a continuación en la Figura IV.52.

También se puede observar que la mayor contribución a la resistencia total es la resistencia reversible de la membrana, en todos los ensayos. Esto significa que la formación de torta es el principal mecanismo involucrado en el ensuciamiento de la membrana. Comparando ambos MBR, se observa que la diferencia entre las resistencias totales es debida a los valores R_{rev} medidos.

En la Figura IV.51 se muestra el aspecto de la corriente de permeado obtenida tras ultrafiltrar el licor de mezcla de ambos MBR. Se observa que el permeado procedente del MBR con alta concentración de sólidos (MBR-HS) es más coloreado.

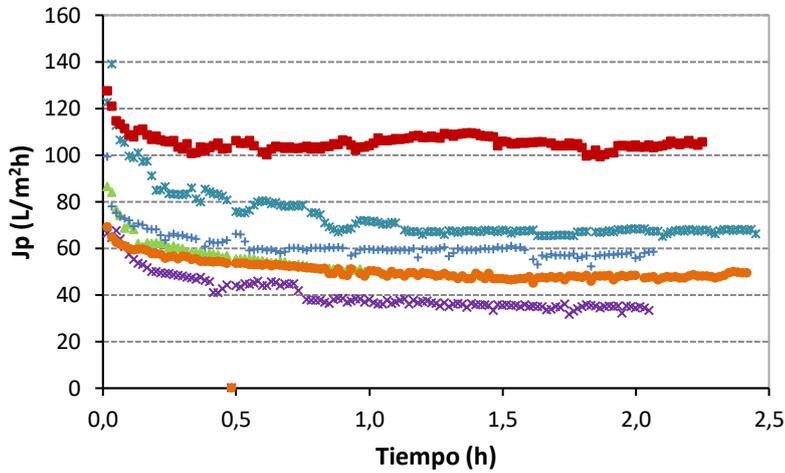


Figura IV.51: Aspecto de la corriente de permeados obtenidos tras la ultrafiltración del licor de mezcla del MBR-LS (izqda.) y MBR-HS (drcha.)

En la Figura IV.52 se muestra la densidad de flujo de permeado obtenida para cada ensayo de ultrafiltración usando como alimentación muestras de licor de mezcla procedentes del MBR-LS y MBR-HS. En general, puede observarse para todos los ensayos una disminución más acusada de la densidad de flujo de permeado al principio del ensayo, sobretodo en el caso del MBR-HS, que se atenúa hasta alcanzar el estado estacionario, lo que corresponde a un perfil típico de comportamiento de las membranas de ultrafiltración.

Se observa que las muestras procedentes del MBR-HS muestran una menor filtrabilidad que las muestras del MBR-LS. De hecho, en el caso del MBR-HS, sólo para la muestra 6 se logró una densidad de flujo de permeado superior a $25 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, que es menor que el flujo mínimo obtenido en la UF de las muestras del MBR-LS ($35 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$).

▲ 1 MBR-LS × 2 MBR-LS × 3 MBR-LS ● 4 MBR-LS + 5 MBR-LS ■ 6 MBR-LS ^a



▲ 1 MBR-HS × 2 MBR-HS × 3 MBR-HS ● 4 MBR-HS + 5 MBR-HS ■ 6 MBR-HS ^b

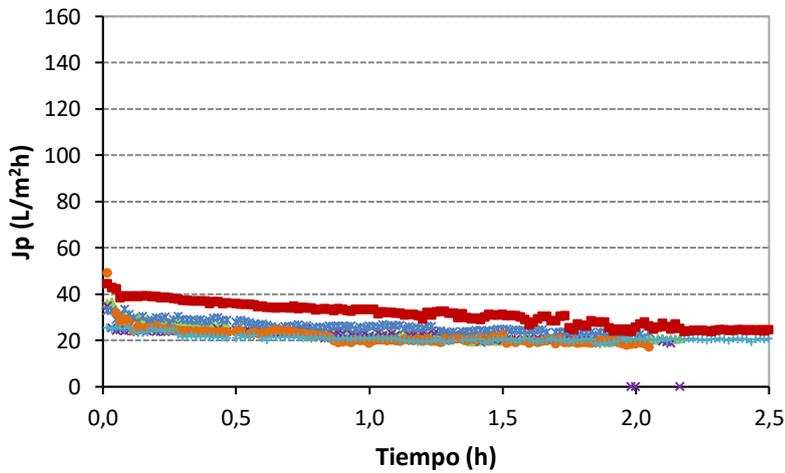


Figura IV.52: Ensayos de ultrafiltración a escala de laboratorio. Evolución de densidad de flujo de permeado utilizando licor de mezcla del MBR-LS (a) y MBR-HS (b). $PTM = 1 \text{ bar}$, $T = 25^{\circ}\text{C}$ y $v = 2 \text{ m/s}$

La mayor concentración de SMP en el MBR-HS en comparación con el MBR-LS y la composición del agua residual influente son las causas que explican los bajos resultados de densidad de flujo de permeado para el filtrado de las muestras de licor de mezcla del MBR-HS. Por otro lado, las

Resultados y Discusión

altas concentraciones de SMP en las muestras del MBR-HS no permiten apreciar diferencias entre la densidad de flujos de permeado obtenidos en los ensayos de ultrafiltración.

Sin embargo, en el caso de las muestras del MBR-LS, se observa relación entre las concentraciones de SMP carbohidratos (SMPc) y las densidades de flujos de permeado obtenidos en los ensayos de UF, siendo $r_p = -0.6616$ ($p\text{-value} = 0.0138$). De hecho, las muestras con concentraciones más bajas de SMPc (muestras 3 y 6) corresponden a las muestras con los valores de densidad de flujo permeado más alto.

Otros autores como Reid et al. (2008) identificaron también a los SMP-carbohidratos como el principal indicador de ensuciamiento de la membrana, y por tanto, correlacionado negativamente con la permeabilidad de la membrana [28]. Generalmente, se cree que la naturaleza hidrofílica de los SMP junto con el intervalo de tamaño de partícula subcoloidal (100 a 10000 Da [37]) promueve el taponamiento de los poros de la torta formada sobre la membrana, así como también la formación de geles pegajosos sobre la superficie de la membrana [28].

En cuanto a los eEPS medidos, en este caso no son un parámetro influyente en el comportamiento de los licores de mezcla en los ensayos de UF. Esto puede ser debido a su baja concentración. Reid et al. (2008) tampoco encontraron correlación entre la permeabilidad del licor de mezcla para concentraciones promedio de EPS de 45 mg/gSS [28].

Por otro lado, tampoco se encontró relación entre la concentración de SSLM y la densidad de flujo de permeado. Así, las máximas densidades de flujos de permeado se obtuvieron con la muestra 6 tanto en el MBR-LS (104 L/(m²·h)) como en el MBR-HS (25 L/(m²·h)), correspondientes a concentraciones de SSLM de 23.62 y 20.83 g/L, respectivamente. Lousada-Ferreira et al. (2015) tampoco encontraron correlación entre ambos parámetros trabajando con MBR sumergidos que tratan aguas residuales urbanas [33].

En las Figura IV.53 y Figura IV.54 se muestra la permeabilidad de la membrana al agua antes y después del ensayo de ensuciamiento con licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS (tras la limpieza de la membrana con agua destilada).

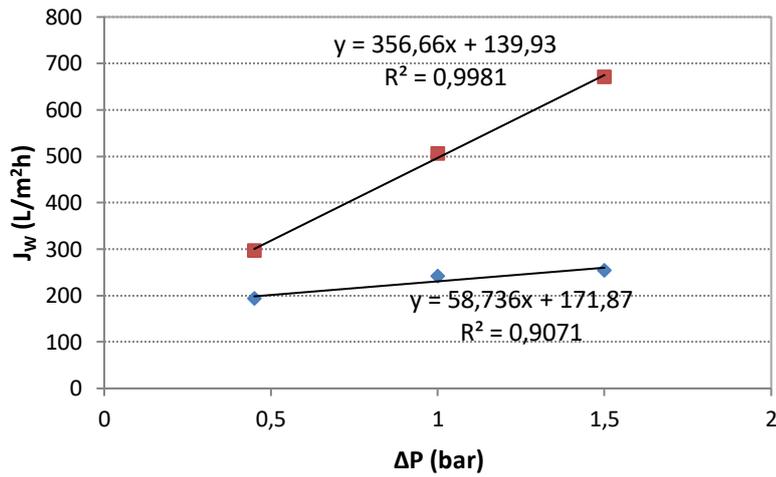


Figura IV.53: Permeabilidad de la membrana al agua antes y después del ensayo de ensuciamiento con licor de mezcla del MBR-LS (tras la limpieza de la membrana con agua destilada)

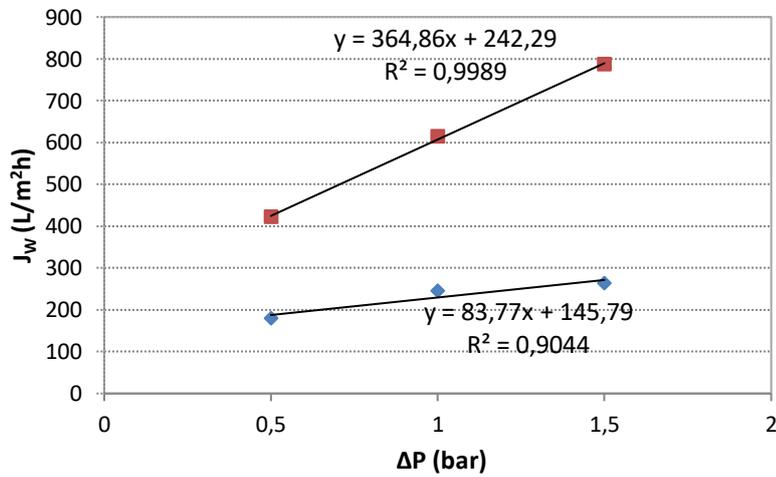


Figura IV.54: Permeabilidad de la membrana al agua antes y después del ensayo de ensuciamiento con licor de mezcla del MBR-HS (tras la limpieza de la membrana con agua destilada)

En ambos MBR se observa que la permeabilidad no se recupera tras el lavado con agua destilada y, que por tanto, sería necesaria la realización de una limpieza química adicional para poder recuperar la permeabilidad inicial de la membrana. Sin embargo, no se contempló el estudio de otro protocolo de limpieza ya que no era objeto de esta tesis.

5.3.3. *Tiempo de succión capilar*

El tiempo de succión capilar (TSC) se midió con el fin de evaluar la capacidad de deshidratación del licor de mezcla mediante filtración. Dadas las características del licor de mezcla, se utilizó el tubo de 1 cm de diámetro, apropiado para muestras con elevada concentración de sólidos.

Los resultados confirmaron que el licor de mezcla del MBR-HS era menos deshidratable que el del MBR-LS, ya que los valores de TSC eran muy altos (1629 s como valor promedio) en comparación con el licor de mezcla del MBR-LS (83,5 s). Esta diferencia puede atribuirse probablemente a la mayor concentración de SMP_c en el MBR-HS que en el MBR-LS. Por tanto existe una correlación positiva entre el TSC y SMP_c que, en nuestro caso, se comprueba mediante el coeficiente de correlación de Pearson, el cual en el caso del TSC y la concentración de SMP_c en el MBR-LS muestra un valor de $r_p = 0.8331$ (p -valor = 0.0394). Estas correlaciones positivas entre el TSC y SMP_c también han sido encontradas por Reid et al. (2008) y Sabia et al. (2013) [28,46].

Además, el licor de mezcla con mayor TSC (MBR-HS) coincide con el licor de mezcla que ofrece mayor resistencia a la filtración (R_t) (datos mostrados en la Tabla IV.14, muestra 4). La correlación entre el TSC y la R_t en el MBR-HS se confirma con el valor $r_p = 0.8502$ (P -valor = 0.0037).

5.3.4. *Reología del fango activo*

Tal y como se ha comentado anteriormente, el fango activo es un fluido no newtoniano con un comportamiento pseudoplástico [50]. En la

Figura IV.55 se muestra, a modo de ejemplo, la variación de la viscosidad aparente (η) y el esfuerzo cortante (τ) con la velocidad de cizallamiento ($\dot{\gamma}$) para la muestra 2 de ambos MBR.

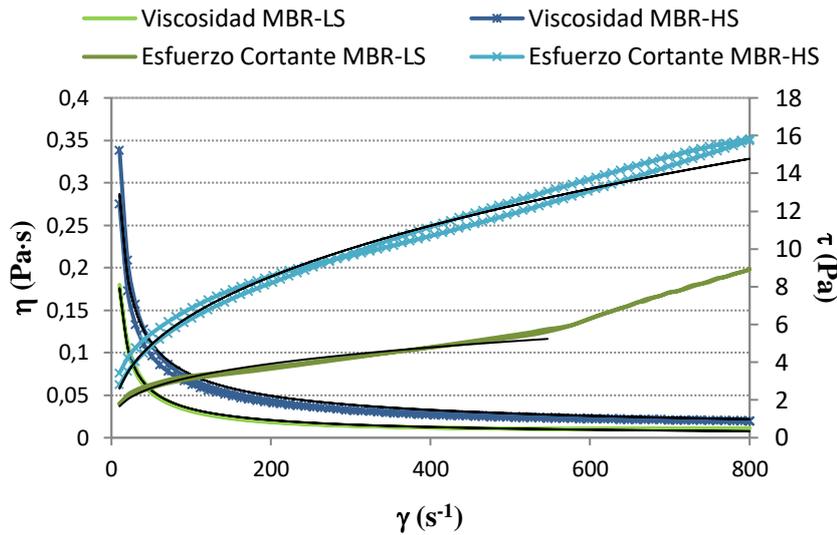


Figura IV.55: Comparación entre la viscosidad aparente y esfuerzo cortante del licor de mezcla del MBR-LS y del MBR-HS (muestra 2)

La evolución de estos parámetros reológicos se modelizó utilizando el modelo de Ostwald de Waele (línea continua), donde el esfuerzo cortante se puede expresar en función de la velocidad de cizallamiento como $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$ y la viscosidad aparente como $\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$, siendo los parámetros K y n el índice de consistencia y el índice de comportamiento de flujo, respectivamente. Para la muestra de MBR-LS, el ajuste se ha realizado de 0 a 540 s⁻¹, ya que a partir de esta velocidad de cizallamiento, se generaba una turbulencia excesiva que provocaba la aparición de vórtices de Taylor [16].

Se puede observar que la viscosidad aparente del licor de mezcla del MBR-HS es considerablemente mayor que la del MBR-LS, lo que podría explicar su menor filtrabilidad. Este comportamiento fue muy similar en las 6 muestras analizadas de cada MBR.

5.3.5. Potencial zeta

En la Tabla IV.15 se muestran las medidas de potencial zeta medidas en la fracción soluble del licor de mezcla de ambos MBR.

Tabla IV.15: Potencial zeta (mV) medido en la fracción soluble del licor de mezcla del MBR-LS y MBR-HS

Muestra	1	2	3	4	5	6
<i>MBR-LS</i>	-18,4	-17,7	-18	-18,6	-22.9	-26.6
<i>MBR-HS</i>	-36,3	-35,2	-33,1	-40,8	-47.4	-42.1

Teniendo en cuenta que la mayoría de los componentes de la fracción líquida del licor de mezcla centrifugado son SMP y que los principales componentes de los SMP son proteínas, se esperan potenciales zeta negativos por ser el pH del licor de mezcla superior al punto isoeléctrico de las proteínas, que suele corresponder con valores de pH más bajos.

En general, además de la fracción soluble, los propios flóculos del fango activo se cargan negativamente como resultado de las interacciones fisicoquímicas entre microorganismos (principalmente bacterias), partículas inorgánicas (silicatos, fosfato de calcio y óxidos de hierro), polímeros extracelulares y cationes multivalentes [43]. Si la carga negativa es alta, los coloides permanecen dispersos en suspensión, lo que puede afectar a la sedimentabilidad del fango, pero en el caso de un tratamiento con membranas este hecho no supone un problema.

Los valores de potencial zeta negativos (en términos absolutos) fueron mayores en el MBR-HS que en MBR-LS, lo que es debido a la diferente composición de los coloides.

5.4. RESPIROMETRÍA

Los ensayos de respirometría sirven para determinar los parámetros biocinéticos de caracterización del licor de mezcla, como es el coeficiente de producción de biomasa. También sirve para determinar la fracción orgánica no biodegradable presente en el licor de mezcla, la cual permanece en los flóculos bacterianos hasta que ésta se extrae del sistema a través de la purga de licor de mezcla o pase a través de las membranas si no fuera retenida por éstas. Mientras tanto, esta fracción orgánica contribuye a disminuir la filtrabilidad del licor de mezcla, favoreciendo el ensuciamiento de la membrana al mismo tiempo. Camilleri-Rumbau et al. (2014) obtuvieron flujos de permeado muy bajos en la microfiltración (0,2 μm de tamaño de poro) de la corriente líquida procedente del digerido de un digestor anaerobio que trata el 50% de purín de cerdo, 15% de estiércol de ganado, 10% de estiércol de pollo y 25% de residuos alimentarios, con una concentración de sólidos de 27 g/L [51]. Es decir, el influente era muy similar al tratado en el MBR-HS. En general, en este estudio se observó que cuanto mayor es la concentración de sólidos en el influente, menor es la densidad de flujo de permeado obtenida.

Para el cálculo del coeficiente de producción de biomasa heterótrofa (Y_H), se realizó un ensayo dinámico en el que se calcula el consumo de oxígeno (OC), a partir de la tasa de respiración (R_s), cuando los microorganismos degradaban una muestra de 400 mg/L de acetato de sodio. En la Figura IV.56 se muestra el respirograma obtenido, a modo de ejemplo, para la muestra 3 del MBR-HS. El OC se calcula mediante la integral del área bajo la curva.

Resultados y Discusión

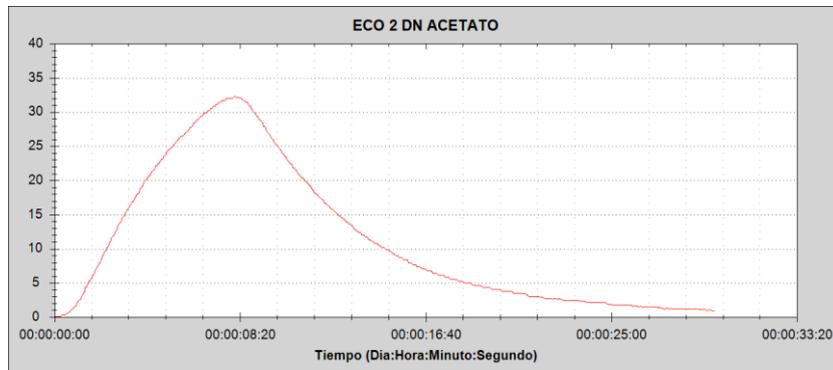


Figura IV.56: Evolución de la tasa de respiración (R_s en $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$) al adicionar acetato de sodio al licor de mezcla del MBR-HS

El coeficiente Y_H , calculado de acuerdo con la Ec. 20 (sección 3, Capítulo III), fue de 0,674 y 0,71 para el MBR-LS y MBR-HS, respectivamente. Estos valores mostraron que los microorganismos exhiben un crecimiento óptimo cuando se añade un sustrato rápidamente biodegradable (acetato de sodio) al licor de mezcla.

En la Figura IV.57 y Figura IV.58 se muestran los respirogramas obtenidos al adicionar al licor de mezcla, lixiviado y lixiviado filtrado a $0.45 \mu\text{m}$, para calcular la DQO biodegradable total y la DQO soluble, respectivamente (muestra 3 MBR-HS).

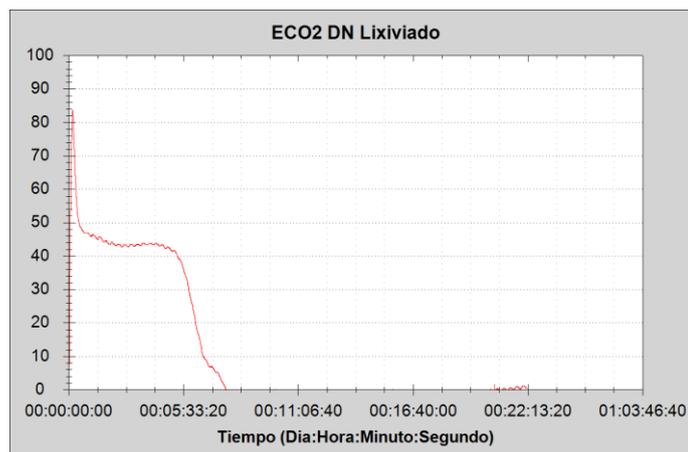


Figura IV.57: Evolución de la tasa de respiración (R_s en $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$) al adicionar lixiviado al licor de mezcla

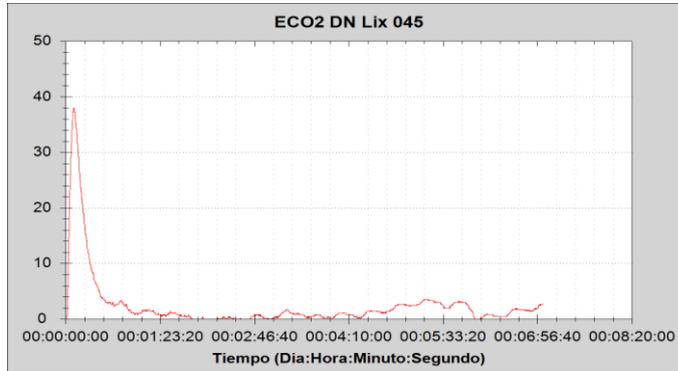


Figura IV.58: Evolución de la tasa de respiración (R_s en $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$) al adicionar lixiviado filtrado al licor de mezcla

Tal y como se observa en ambas figuras, la tasa de respiración obtenida con el lixiviado sin filtrar es superior, llegándose a alcanzar valores de $85 \text{ mgO}_2/(\text{L}\cdot\text{h})$, mientras que con el lixiviado filtrado se alcanzan valores de $38 \text{ mg O}_2/(\text{L}\cdot\text{h})$. Las áreas bajo las curvas se pueden calcular mediante integración, representando el consumo de oxígeno (OC). Los valores obtenidos fueron de $28198 \text{ mg O}_2/\text{L}$ en el caso del lixiviado sin filtrar y $4544 \text{ mg O}_2/\text{L}$ en el del lixiviado filtrado a $0.45\mu\text{m}$.

La Tabla IV.16 muestra las diferencias entre la DQO obtenida espectrofotométricamente y la DQO biodegradable obtenida respirométricamente en ambos MBR.

Tabla IV.16: Fraccionamiento de la DQO obtenido mediante espectrofotometría y respirometría

	MBR-LS (mg/L)	MBR-HS (mg/L)
DQO _{espectrofotometría}		
Total	6580	70000
Soluble	2930	10400
DQO _{respirometría}		
Total	4854	64088
Soluble	1931	10328
DQO Inerte calculada		
Total	1726	5912
Soluble	999	72

Resultados y Discusión

Tal y como se observa en la Tabla IV.16, los valores de DQO total y soluble medidos espectrofotométricamente en el fango del MBR-HS fueron de 70000 y 10400 mg/L, respectivamente. Dado que la DQO soluble obtenida espectrofotométricamente es muy similar a la DQO obtenida mediante respirometría (10328 mg/L), puede afirmarse que la gran mayoría de la DQO soluble es rápidamente biodegradable. La DQO inerte total para el MBR-LS y MBR-HS supone un 26-35% y 8,4-9,2%, respectivamente.

Sin embargo, la DQO inerte particulada, diferencia entre la DQO total y soluble inerte, es muy elevada en ambos reactores. Cuando se comparan los resultados con los obtenidos para el MBR-LS, se puede observar que la DQO inerte particulada en el MBR-HS fue considerablemente mayor que en el MBR-LS, suponiendo un 98% respecto a la DQO inerte total frente al 42% para el MBR-LS. Esto puede explicar las diferencias encontradas en los licores de mezcla en términos de propiedades físicas y estructura, y por consiguiente las diferencias en la filtrabilidad.

6. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN Y LAS CARACTERIZACIONES REALIZADAS

6.1. INFLUENCIA DEL TRH Y LA C_m EN LOS PARÁMETROS MEDIDOS EN EL LICOR DE MEZCLA PROCEDENTE DEL MBR URBANO

De los parámetros de operación más comúnmente utilizados en los procesos de fangos activos: carga másica (C_m), tiempo de retención hidráulico (TRH) y edad del fango, se han seleccionado los dos primeros para el estudio de su influencia en los parámetros medidos en el licor de mezcla del MBR urbano. Esto es debido a que en la EDAR urbana de estudio, las purgas de fango eran mínimas y se realizaban de forma no periódica, dando lugar a edades de fango muy elevadas y difíciles de estimar correctamente. La razón de las bajas cantidades de fango purgadas era el poco crecimiento celular, debido a la muy baja carga másica mantenida, lo cual a su vez estaba provocado por el bajo caudal de entrada respecto al caudal de diseño de la instalación.

Con el fin de comprobar si existe correlación entre el TRH y la C_m con diferentes parámetros medidos experimentalmente en las muestras de licor de mezcla, se ha realizado un análisis de la varianza, ANOVA, y se ha calculado el intervalo LSD (del inglés *Least significant difference*, mínima diferencia significativa), el cual forma un intervalo de confianza para cada par de medias con un nivel de confianza del 95%. A continuación, se muestran los intervalos de confianza obtenidos con el método LSD de Fisher con los que el TRH ha resultado ser significativo.

En la Figura IV.59 se muestran los intervalos LSD para el factor TRH tomando como variables dependientes el TSC, la viscosidad y el D[4.3]. Se considera TRH alto entre 90 y 100 h, medio entre 70 y 89 h y bajo entre 40 y 69 h.

Resultados y Discusión

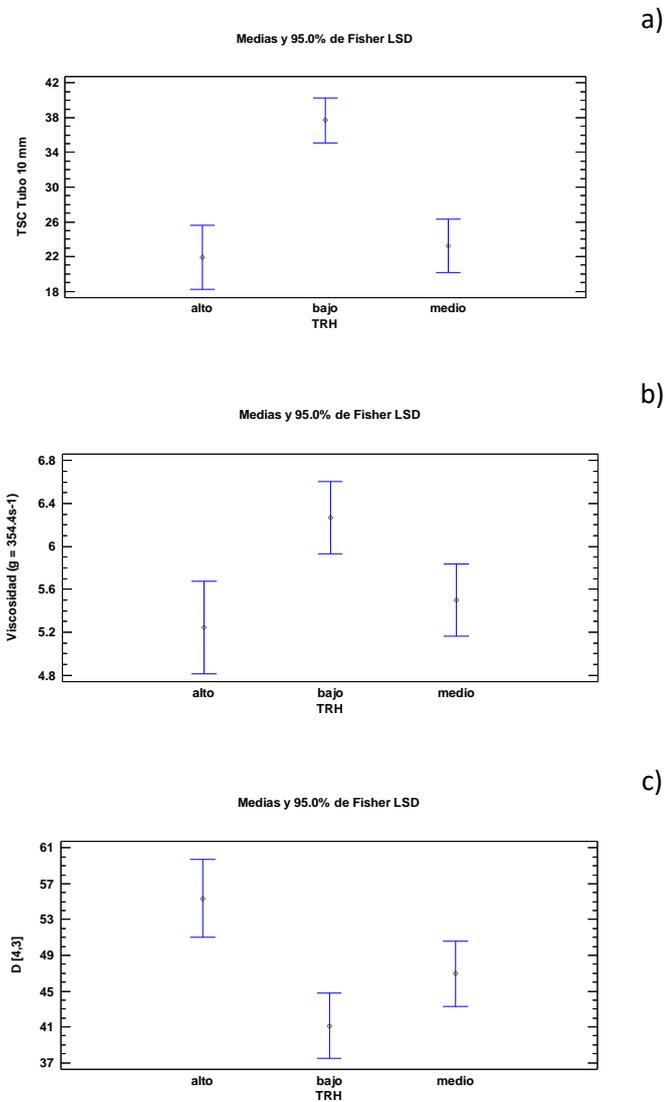


Figura IV.59: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) el TSC, (b) la viscosidad y (c) el tamaño medio de partícula, del licor de mezcla procedente del MBR urbano, con el TRH

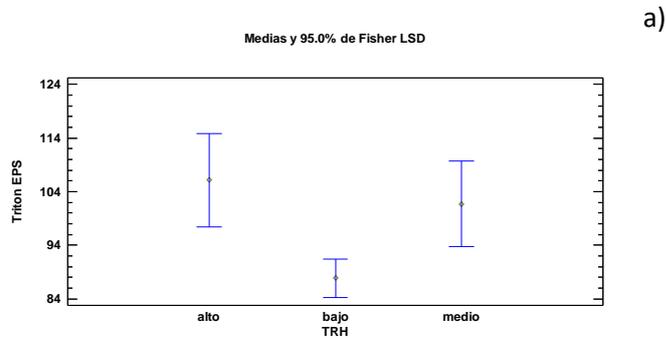
A la vista de la Figura IV.59a, se observa que un tiempo de retención hidráulico alto implica un tiempo de succión capilar bajo, lo que indica que

la filtrabilidad del fango es mejor. Por lo tanto, la membrana se ensuciará menos si se opera con un TRH alto.

Por otro lado, si el TRH es alto, se observa que la viscosidad del fango es baja (Figura IV.59b), luego también será mejor la filtrabilidad del fango [52].

En cambio, en la Figura IV.59c se observa que un TRH alto implica un mayor tamaño de partícula. Estos resultados son coherentes con los datos mostrados en la Tabla IV.9, donde se observa que el TSC y la viscosidad tienen una correlación inversa con el tamaño de partícula.

En cuanto a los parámetros químicos, la correlación es significativa en el caso de las eEPS extraídas con el método Triton X-100, lo que es debido a que la extracción con los métodos CER es menos efectiva. Tampoco se ha encontrado correlación con los compuestos solubles microbianos dada su baja concentración en las muestras estudiadas. En la Figura IV.60 se muestran los intervalos LSD para el factor TRH tomando como variables dependientes las eEPS, eEPSp y eEPSc considerando el método Triton X-100 para la extracción.



Resultados y Discusión

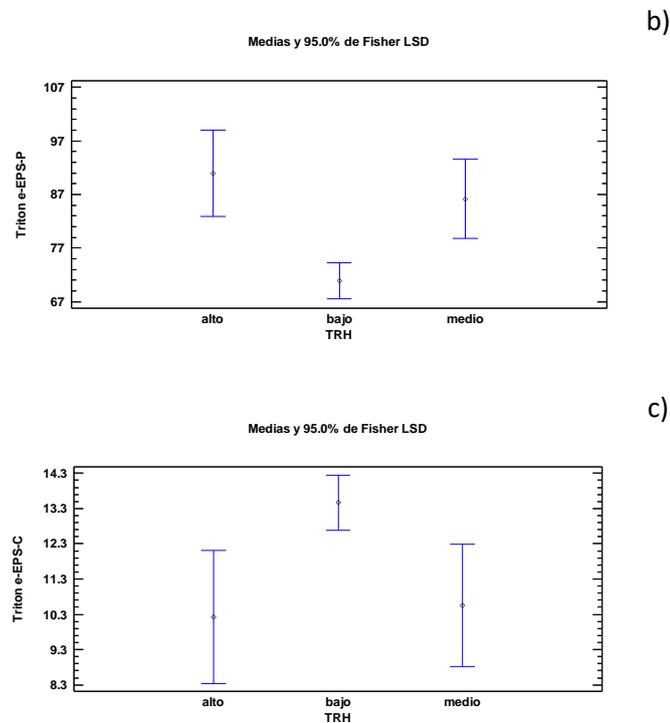


Figura IV.60: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) las eEPS, (b) las eEPSp y (c) las eEPSc, extraídas del licor de mezcla procedente del MBR urbano, con el TRH. Método de extracción Triton X-100

Se observa que tanto las eEPS como las eEPSp (principal componente de las EPS) aumentan cuando el tiempo de retención hidráulico es mayor (Figura IV.60 a y b). En cambio los carbohidratos son mayores a un TRH bajo (Figura IV.60c).

En la Figura IV.61 se muestran los intervalos LSD para la carga másica tomando como variables dependientes el TSC, la viscosidad y el D[4.3].

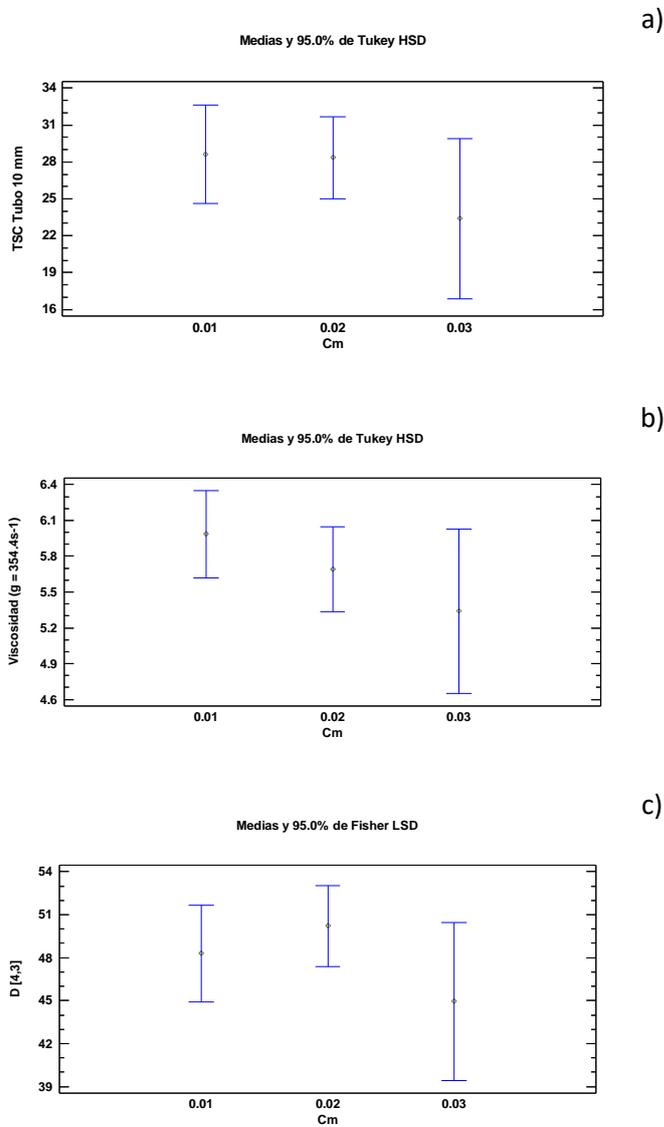


Figura IV.61: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) el TSC, (b) la viscosidad y (c) el tamaño medio de partícula, del licor de mezcla procedente del MBR urbano, en función de la Cm

Tal y como se observa en la Figura IV.61, no existe correlación entre la carga másica y los parámetros TSC, viscosidad y tamaño medio de partícula. Ello es debido a que todos los valores de Cm son muy bajos y similares

Resultados y Discusión

entre sí (0.01, 0.02 y 0.03 kgDBO₅/(kgSSVLM·d)), no influyendo su pequeña variación en los valores de las variables analizadas.

En cuanto a los parámetros químicos, sí se ha encontrado correlación estadística entre la carga másica y las eEPS extraídas con el método Triton X-100. En la Figura IV.62 se muestran los intervalos LSD para el factor Cm tomando como variables dependientes las eEPS totales y eEPS proteínas.

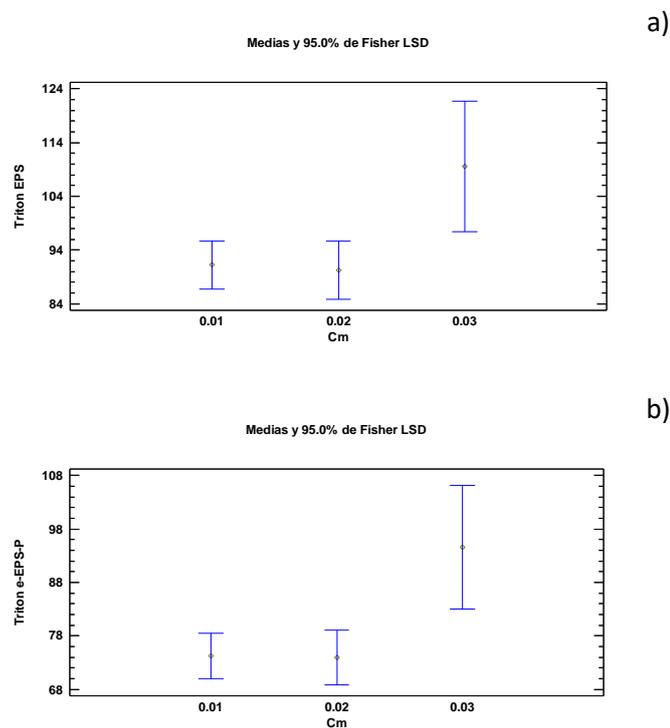


Figura IV.62: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) las eEPS y (b) las eEPSp, extraídas del licor de mezcla procedente del MBR urbano, en función de la Cm. Método de extracción Triton X-100

Se observa que a medida que aumenta la Cm, aumenta el contenido en eEPS (Figura IV.62a). Esto es debido a que al tener alimento las bacterias, éstas están más activas y son capaces de generar más eEPS. Este resultado se confirma con el intervalo LSD obtenido para las eEPSp, que son el mayor componente de las eEPS (Figura IV.62b). En cambio, no se ha

encontrado correlación con la concentración de carbohidratos extraída, lo que es debido a su baja concentración.

Al igual que sucedía con el tiempo de retención hidráulico, no se ha encontrado correlación significativa entre la C_m y las eEPS extraídas con los métodos CER y los compuestos solubles microbianos (SMP), debido a su baja concentración en las muestras analizadas.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Meng et al. (2009) y Sun et al. (2006). El incremento de la carga másica, o de la carga orgánica, produce un aumento de la producción de EPS, ya que la formación de EPS está ligada al crecimiento de la biomasa y al consumo de sustrato [53,54].

6.2. COMPARACIÓN ENTRE LAS eEPS Y SMP PROCEDENTES DE LOS TRES MBR ESTUDIADOS: URBANO E INDUSTRIALES

La composición de SMP y eEPS es altamente variable y depende, entre otras cosas, de la diversidad microbiana del licor de mezcla y las características del afluente [55]. Con el fin de estudiar la influencia de las características del licor de mezcla en la producción de eEPS y SMP, se ha realizado un análisis de la varianza, ANOVA, y se ha calculado el intervalo LSD de Fisher, el cual forma un intervalo de confianza para cada par de medias con un nivel de confianza del 95%. De este modo, se han comparado las eEPS y SMP de los tres MBR estudiados: MBR urbano y los dos MBR industriales referenciados como MBR-LS y MBR-HS.

En la Figura IV.63 se muestran los intervalos LSD calculados tomando como factor el tipo de MBR y como variable dependiente las eEPS (totales (a), proteínas (b) y carbohidratos(c)) extraídas con el método Triton X-100.

Resultados y Discusión

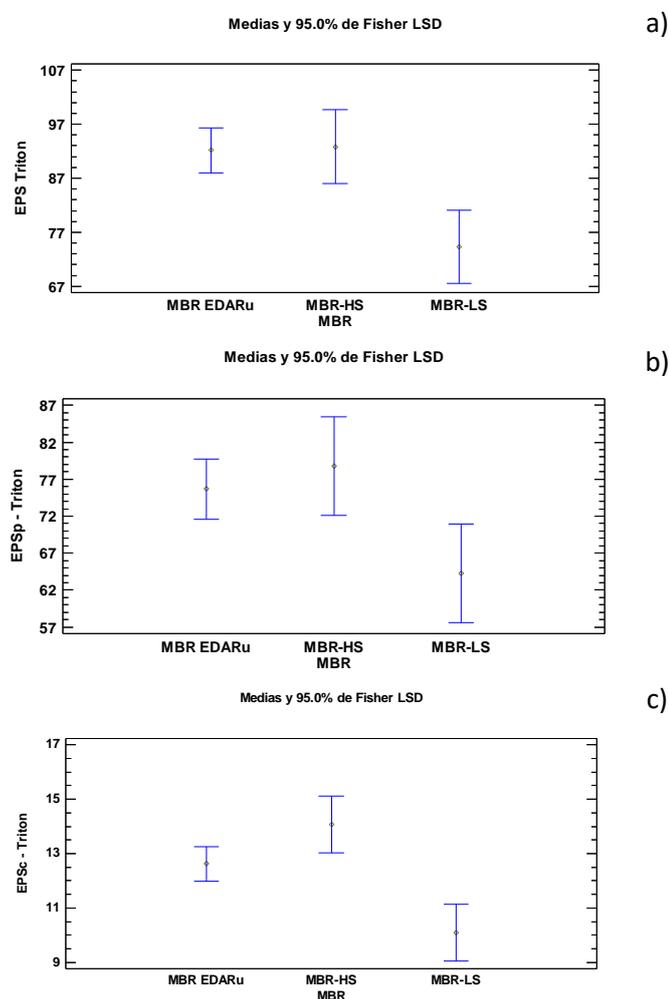


Figura IV.63: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) eEPS totales, (b) eEPSp y (c) eEPSc extraídas de las muestras de licor de mezcla del MBR urbano, MBR-HS y MBR-LS. Método de extracción Triton X-100

Se observa que existe una diferencia significativa entre las EPS extraídas con el método Triton X-100 (totales, proteínas y carbohidratos) entre el MBR-LS y los otros dos MBR estudiados, extrayéndose una menor concentración en éste.

En la Figura IV.64 se presentan los intervalos LSD calculados tomando como factor el tipo de MBR y como variable dependiente las eEPS (totales

(a), proteínas (b) y carbohidratos(c)) extraídas con el método CER en 2 etapas.

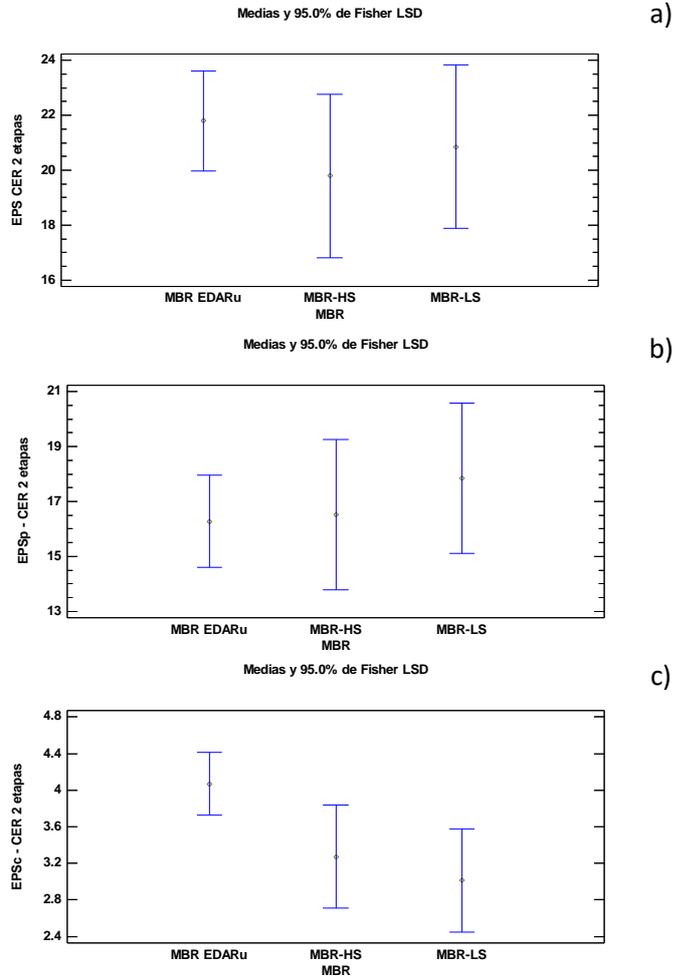


Figura IV.64: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) eEPS totales, (b) eEPSp y (c) eEPSc extraídas de las muestras de licor de mezcla del MBR urbano, MBR-HS y MBR-LS. Método de extracción CER 2 etapas

A diferencia de como sucedía con el método Triton X-100, se observa que no existe una diferencia significativa entre las eEPS extraídas con el método CER en 2 etapas (totales, proteínas y carbohidratos) en los tres MBR estudiados. Esto es debido a que este método extrae menor

Resultados y Discusión

concentración de eEPS. Similares resultados se obtuvieron con el método CER en 1 etapa.

La Figura IV.65 muestra los intervalos LSD tomando como factor el tipo de MBR y como variable dependiente los SMP (totales (a), proteínas (b) y carbohidratos(c)).

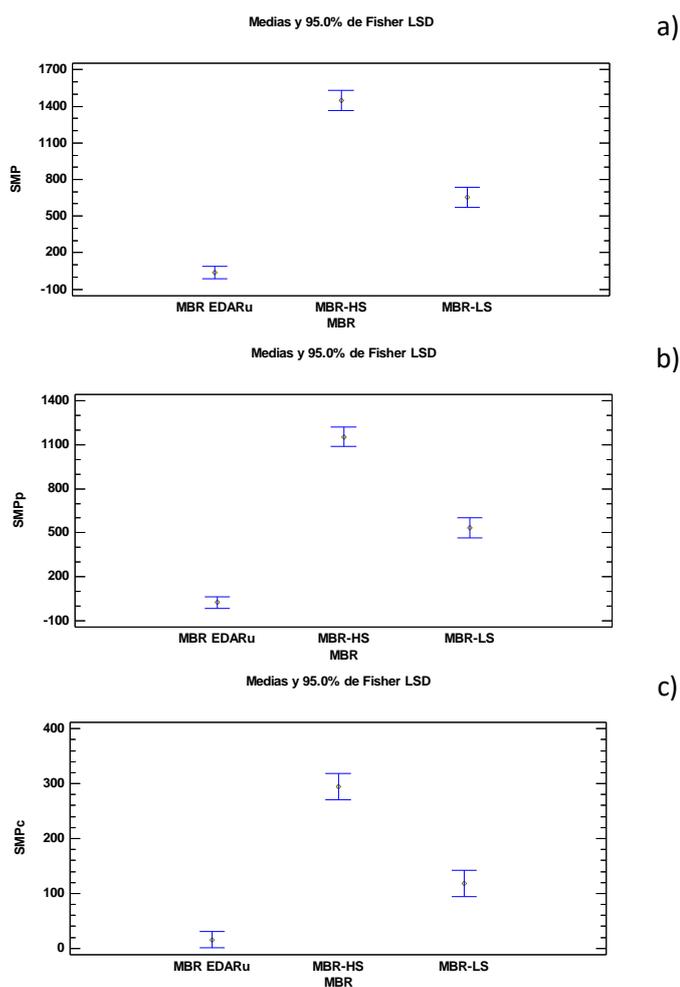


Figura IV.65: Intervalos de confianza LSD obtenidos para (a) SMP totales, (b) SMPp y (c) SMPc de las muestras de licor de mezcla del MBR urbano, MBR-HS y MBR-LS

En este caso se observa que existe una diferencia muy significativa entre los valores de concentración de los SMP (totales, proteínas y

carbohidratos) obtenidos en las muestras de licor de mezcla procedente de los tres MBR estudiados. En el MBR-HS la concentración promedio de los SMP son muy superiores, con un valor de 1400 mg/L frente a los obtenidos en el MBR-LS y en el MBR urbano con concentraciones promedio de 430 y 39 mg/L, respectivamente.

Tal y como se ha comentado en la sección 5.2.1 de este capítulo, las condiciones de estrés al que están sometidas las bacterias del MBR-HS provocan que éstas segreguen mayor concentración de SMP, principalmente causado por la acumulación de sólidos no biodegradables y por la alta salinidad del licor de mezcla.

Si se comparan las concentraciones de eEPS y las de SMP, se concluye que los productos solubles microbianos son los que se ven afectados por las condiciones de estrés de la biomasa, ya que aumenta su concentración considerablemente. En cambio, las eEPS apenas se ven influenciadas. Estudios bibliográficos indican que generalmente los microorganismos responden a situaciones de estrés (como por ejemplo el aumento de la salinidad en los MBR industriales) mediante la disgregación del flóculo [56] y la aceleración de la respiración endógena, acompañada de la liberación de desechos celulares de la secreción y autólisis celular [55]. La influencia de diferentes variables en los SMP se ha analizado con mayor detalle en el apartado 6.3.2.

6.3. REGRESIÓN DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)

6.3.1. MBR urbano

Se ha realizado una modelización de los resultados de las 20 experiencias en las que se midieron los parámetros físicos y químicos incluyéndose también los parámetros de operación carga másica (C_m) y tiempo de retención hidráulico (TRH). Para ello, se ha utilizado un modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales o PLS (*Partial Least Squares*). Tomándose como factores las siguientes variables (X): C_m , TRH, tiempo de

Resultados y Discusión

succión capilar (\varnothing 10 mm), SSLM, SSVLM, viscosidad y tamaño de partículas (D[4,3] y d(0,9)). Como variables respuesta (Y) se han tomado los productos solubles microbianos y las sustancias poliméricas extracelulares extraídas. Se realizaron diferentes modelos, los cuales se muestran a continuación. La selección de las variables X se ha efectuado teniendo en cuenta, por un lado los parámetros más importantes de operación en el proceso de fangos activos (Cm y TRH), y por otro lado, los parámetros físicos más representativos.

En la Tabla IV.17 se muestran los parámetros obtenidos en los 4 modelos realizados R^2X (varianza acumulada por las variables explicativas), R^2Y (coeficiente de correlación) y Q^2 (coeficiente de predicción). Se han modelizado para los resultados obtenidos en los análisis de muestras de la EDARu: (1) las eEPS extraídas con el método Triton X-100 y CER 2 etapas, (2) los SMP, (3) las eEPS extraídas con el método Triton X-100 y (4) las eEPS extraídas con el método CER 2 etapas.

Tabla IV.17: Parámetros del modelo de regresión PLS en el MBR urbano

Modelo	Nº Componentes	R^2X	R^2Y	Q^2
eEPS (Triton y CER)	2	0.867	0.433	0.268
SMP	1	0.807	0.203	0.117
eEPS Triton	1	0.808	0.428	0.325
eEPS CER	1	0.809	0.311	0.168

De acuerdo con los valores mostrados en la Tabla IV.17, se concluye que ninguno de los 4 modelos del MBR urbano es consistente, ya que R^2Y y Q^2 son inferiores a 0.5. Sin embargo, se ha considerado interesante el estudio de cómo afectan las diferentes variables.

A la hora de realizar la regresión por mínimos cuadrados parciales, en primer lugar se ha comprobado que no existe ningún dato anómalo entre las 20 observaciones, formadas a partir de los parámetros analizados. Cada una de ellas representa cada muestra analizada. La ausencia de datos anómalos se justifica mediante la Figura IV.66, dado que todas las

observaciones se encuentran dentro de la elipse de tolerancia basada en la distribución T^2 de Hotelling, con una confianza del 95%. En los 4 casos estudiados todas las observaciones se encontraban dentro de la elipse.

t_1 y t_2 son los *scores*, es decir los valores de las nuevas variables que resumen las variables X. Estas nuevas variables son ortogonales, es decir, independientes.

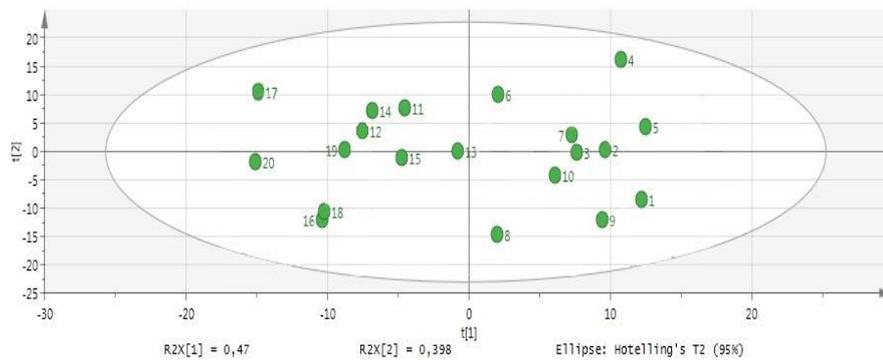


Figura IV.66: Gráfico de dispersión de las 20 observaciones del modelo eEPS Triton y CER)

En la Figura IV.67 se representan simultáneamente en el mismo gráfico las observaciones y las variables X e Y. Para ello, se han escalado los vectores entre -1 y +1.

Resultados y Discusión

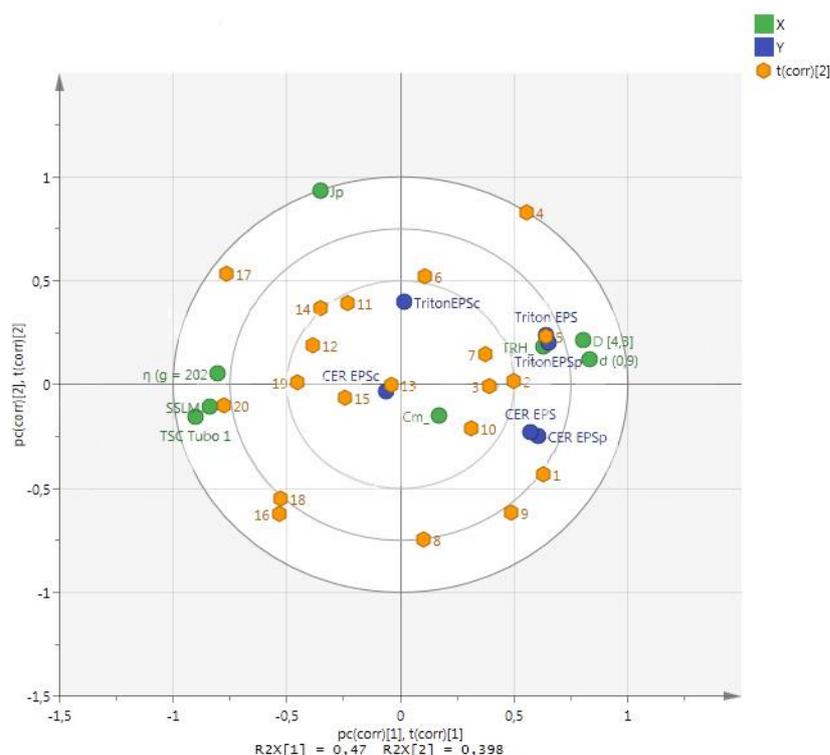


Figura IV.67: Círculos de correlación (Biplot) con las variables Y (Triton EPS, Triton EPSp, Triton EPSc, CER EPS, CER EPSp y CER EPSc), las variables X (TSC, viscosidad, SSLM, d(0,9), D[4,3], Jp, Cm y TRH) y las 20 observaciones del MBR urbano

Las variables cercanas al origen son las peor descritas por las componentes del modelo. En este caso se observa que los carbohidratos extraídos con el método CER en 2 etapas no se describen por el modelo. En el caso de la extracción con Triton X-100 también son los carbohidratos los peor descritos por el modelo.

En las Figura IV.68, Figura IV.69 y Figura IV.70 se representan la dispersión de los pesos de las variables (Loading Scatter Plot). En este caso se ha tomado como variable respuesta los SMP (Figura IV.68), eEPS extraídos con Triton X-100 (Figura IV.69) y los eESP extraídos con resina catiónica CER en 2 etapas (Figura IV.70).

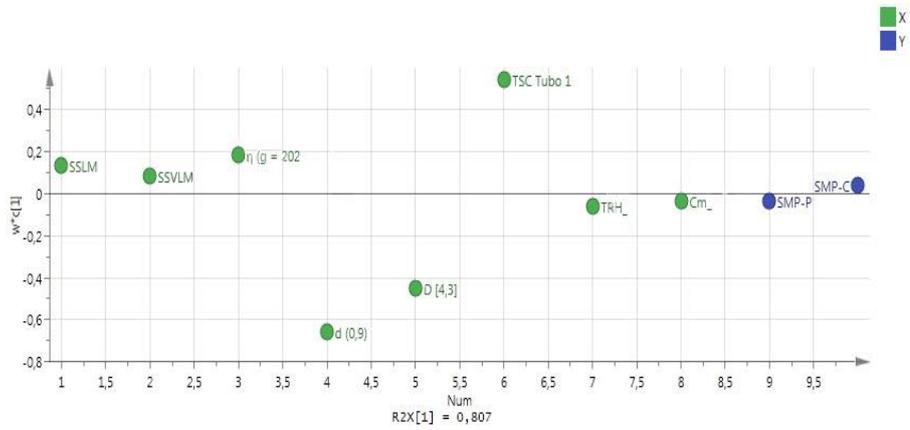


Figura IV.68: Dispersión de los pesos de las variables SMPp y SMPc (Loading Scatter Plot)

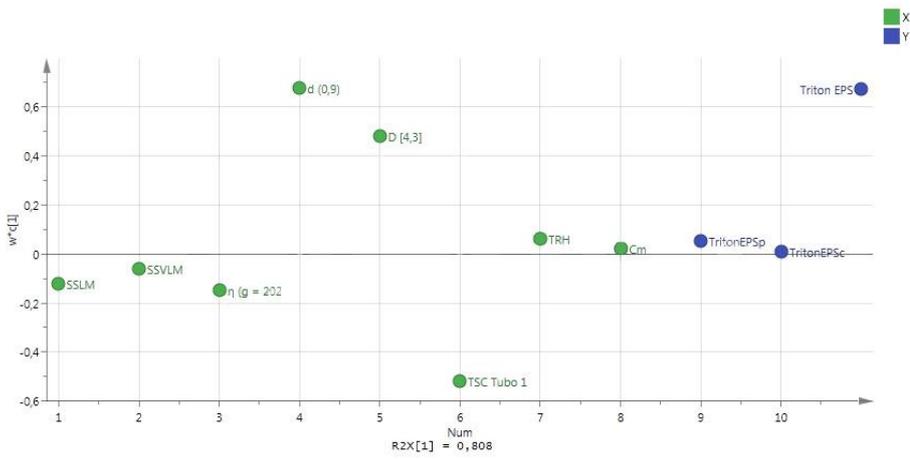


Figura IV.69: Dispersión de los pesos de las variables Triton eEPS, Triton eEPSp y Triton eEPSc (Loading Scatter Plot)

Resultados y Discusión

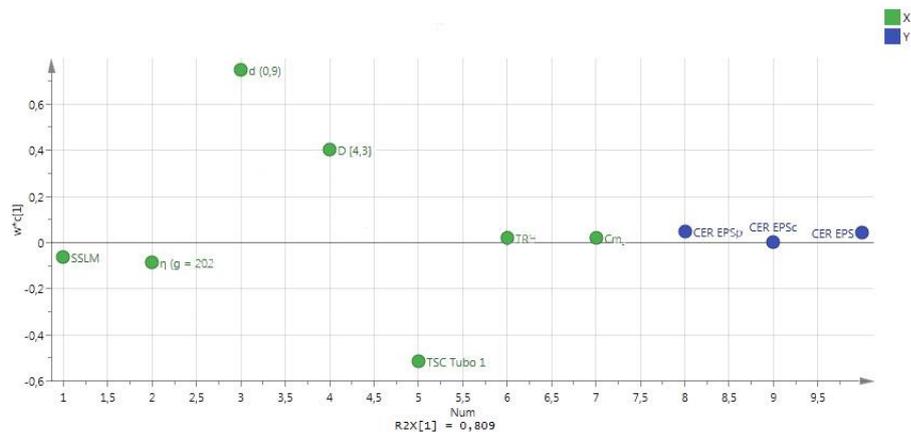


Figura IV.70: Dispersión de los pesos de las variables CER eEPS, CER eEPSp y CER eEPSc en 2 etapas (Loading Scatter Plot)

Se observa claramente en los tres modelos que tanto la carga másica como el tiempo de retención hidráulico tienen poco peso en dichos modelos, lo que es debido a las condiciones de operación de la EDAR urbana. Al tratar menos caudal del previsto en el diseño, la carga másica es muy baja y el tiempo de retención hidráulico es alto, teniendo muy poca variabilidad. En estas condiciones es difícil tener un rango amplio de valores para encontrar diferencias significativas en las caracterizaciones realizadas en el licor de mezcla.

Las variables más influyentes en los tres modelos para el MBR urbano son el TSC y el tamaño de partícula.

6.3.2. MBR Industrial

A continuación, se muestran las regresiones de mínimos cuadrados parciales (PLS) aplicadas a los dos MBR industriales. Dado que el parámetro más significativo en estos ensayos ha sido el de los productos solubles microbianos (SMP), se ha decidido modelizar este parámetro a partir de las variables de operación seleccionadas. Cabe comentar que para la realización del estudio estadístico se han tomado, de cada MBR industrial,

las 15 muestras que fueron caracterizadas, mientras que en el apartado 5 de Resultados, sólo se muestran los resultados de las 6 primeras muestras, que fueron seleccionadas para ilustrar la caracterización físico-química completa.

En la Tabla IV.18 se muestran los valores de los parámetros obtenidos en el modelado de los SMP en ambos MBR: R^2X (varianza acumulada por las variables explicativas), R^2Y (coeficiente de correlación) y Q^2 (coeficiente de predicción).

Tabla IV.18: Parámetros del modelo de regresión PLS en el MBR-LS y MBR-HS

Modelo	Nº Componentes	R^2X	R^2Y	Q^2
MBR-LS SMP	2	0.517	0.931	0.851
MBR-HS SMP	2	0.528	0.829	0.561

Tal y como se observa en la Tabla IV.18 ambos modelos son consistentes, ya que R^2Y y Q^2 son mayores de 0.5 tanto en el MBR-LS como en el MBR-HS.

En primer lugar, se muestran los resultados obtenidos en el MBR-LS. En la Figura IV.71 se observa que no existe ninguna observación anómala entre los datos empleados en el modelo, ya que todos ellos se encuentran dentro de la elipse de tolerancia basada en la distribución T^2 de Hotelling, con una confianza del 95%.

t_1 y t_2 son los *scores*, es decir los valores de las nuevas variables que resumen las variables X. Estas nuevas variables son ortogonales, es decir independientes.

Resultados y Discusión

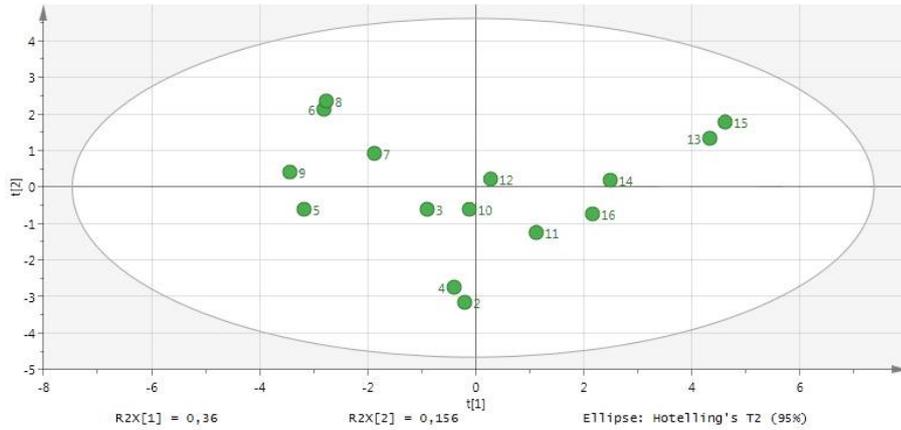


Figura IV.71: Gráfico de dispersión de las 15 observaciones del modelo MBR-LS

A continuación, en la Figura IV.72, se muestra el ajuste obtenido al representar los datos observados frente a los valores predichos.

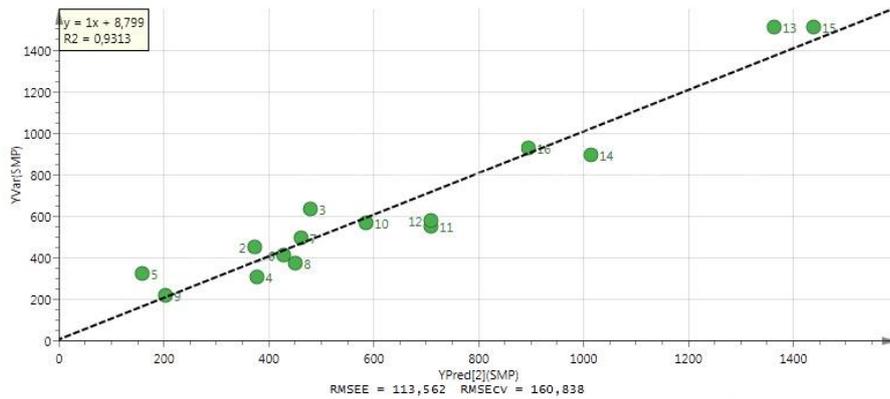


Figura IV.72: Valores de la variable Y (SMP) observados frente a los predichos por el modelo del MBR-LS

Este gráfico muestra las diferencias entre los valores de la variable Y (los SMP) del conjunto de predicciones y los valores de la variable Y predichos para todas las respuestas. Además, se muestra la ecuación obtenida al realizar la regresión lineal:

$$y = 1 \cdot x + 0.8799 \quad R^2 = 0.9313$$

En el pie de la figura se muestra el error cuadrático medio de la estimación, valor RMSEE (Root Mean Square Error of Estimation), que indica el ajuste de las observaciones al modelo (RMSEE = 113.562). El error cuadrático medio RMSEcv es una medida análoga pero la estimación se realiza utilizando el procedimiento de validación cruzada (RMSEcv = 160.838).

En la Figura IV.73 se representa la dispersión de los pesos de las variables (*Loading Scatter Plot*). En este caso se ha tomado como variable respuesta los SMP medidos en el MBR-LS. En la Figura IV.74 se muestran los círculos de correlación obtenidos para la variable Y (SMP) con las variables X utilizadas en el modelo y las 15 observaciones.

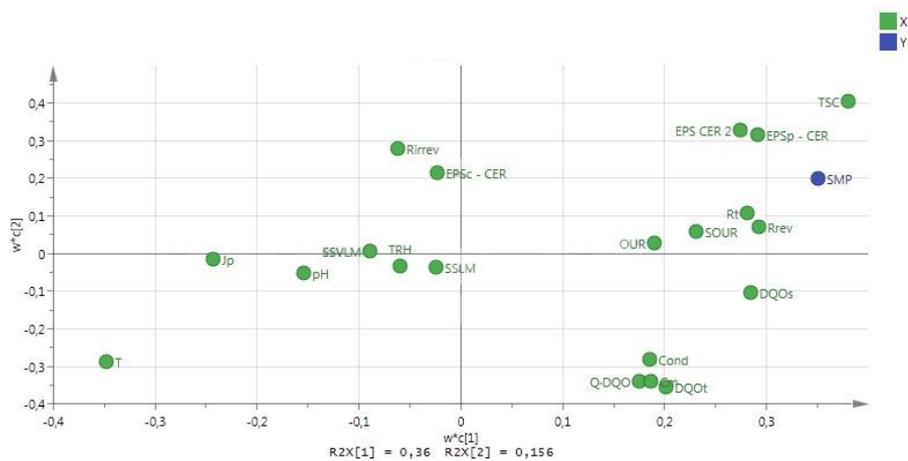


Figura IV.73: Dispersión de los pesos de la variable SMP del MBR-LS (*Loading Scatter Plot*)

Resultados y Discusión

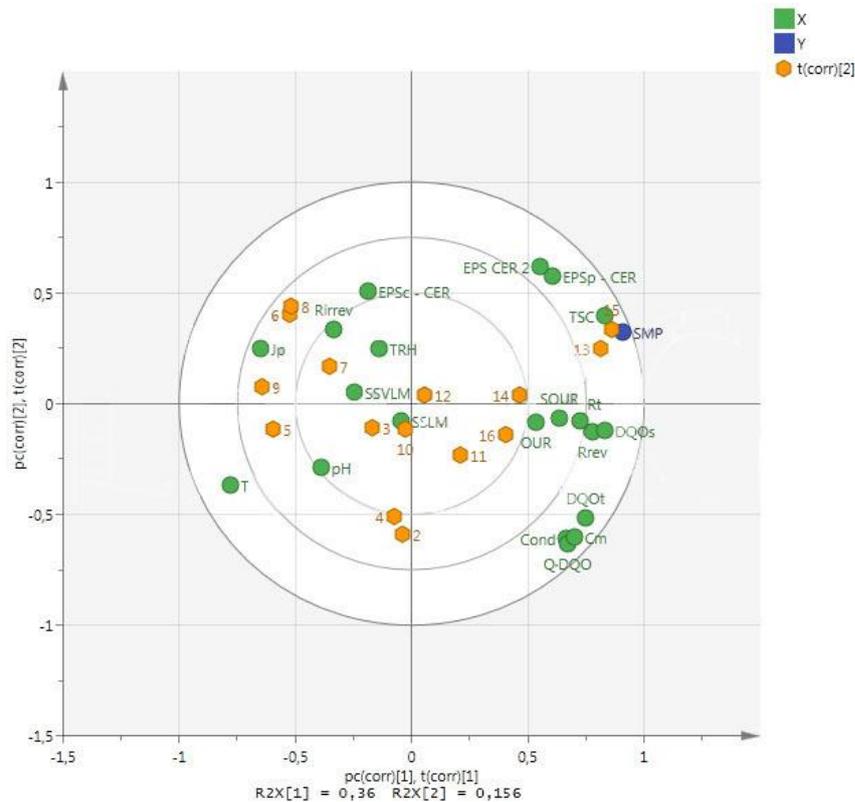


Figura IV.74: Biplot. Círculos de correlación obtenidos para la variable Y (SMP) con las variables X estudiadas y las 15 observaciones del MBR-LS

Tal y como se observa en la Figura IV.73 y Figura IV.74, los parámetros que menos influyen en la producción de SMP son los SSLM, SSVLM y el TRH, ya que se encuentran junto al origen. Por el contrario, se observa una gran relación entre los SMP y el tiempo de succión capilar y, por consiguiente, de forma inversa con la filtrabilidad del fango. Además, la temperatura también es un parámetro influyente en la producción de SMP, como lo es en cualquier cinética de una reacción bioquímica. Cabe destacar que la relación es inversamente proporcional, ya que a menor temperatura la producción de SMP aumenta. Esto fue también observado por Drews et al. 2007 [57] en un MBR piloto que trabajó entre 11 y 32°C.

Otros parámetros directamente relacionados con la producción de SMP son la DQO (tanto total como soluble) y, por consiguiente, la carga orgánica (Q·DQO) y la carga másica, además de la conductividad.

El efecto de la conductividad en la producción de SMP también fue observado por Lay et al. (2010), quienes también observaron que el aumento de la salinidad agravaba el ensuciamiento de la membrana, debido a problemas de incrustaciones y ensuciamiento coloidal [58]. Además, Luo et al. (2010) realizaron un estudio del efecto de la salinidad en la biomasa de un proceso MBR, en el que concluyeron que a elevada salinidad aumentaba la concentración de SMP, aumentando de 150 a 536 mg/L al aumentar la salinidad de 4.5 a 16 g NaCl/L. Este incremento de SMP puede ser atribuido a la autólisis de las células y a la acumulación de productos no metabolizados derivados de la incompleta degradación de las sustancias orgánicas [55,56]. Por tanto, una conductividad elevada provoca una situación de estrés bacteriano que se traduce en un aumento de la producción de SMP.

En segundo lugar se muestran los resultados obtenidos en el MBR-HS. En la Figura IV.75 se muestra que no existe ningún dato anómalo entre los datos empleados en el modelo del MBR-HS, ya que todos ellos se encuentran dentro de la elipse de tolerancia basada en la distribución T^2 de Hotelling, con una confianza del 95%.

t_1 y t_2 son los *scores*, valores de las nuevas variables que resumen las variables X . Estas nuevas variables son ortogonales, es decir independientes.

Resultados y Discusión

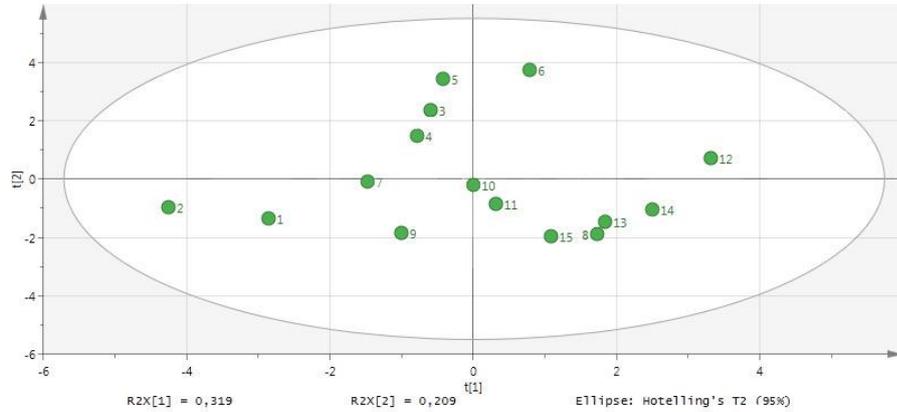


Figura IV.75: Gráfico de dispersión de las 15 observaciones del modelo MBR-HS

A continuación, en la Figura IV.76 se muestra el ajuste obtenido al representar los datos observados frente a los predichos.

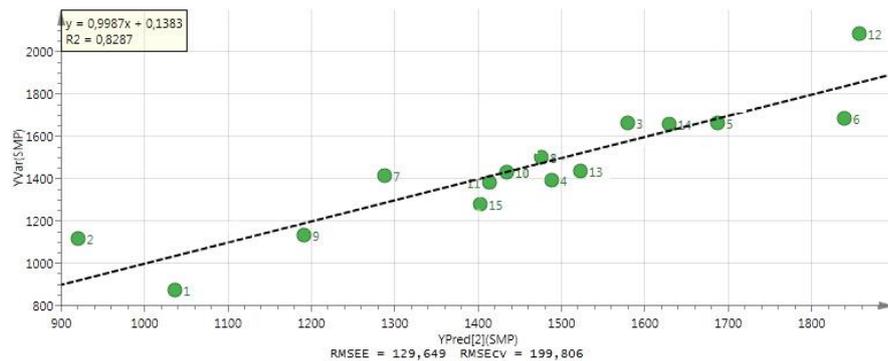


Figura IV.76: Valores de la variable Y (SMP) observados frente a los predichos por el modelo del MBR-HS

La Figura IV.76 muestra las diferencias entre los valores de la variable Y (los SMP) del conjunto de predicciones y los valores de la variable Y predichos para todas las respuestas. Además, se muestra la ecuación obtenida al realizar la regresión lineal:

$$y = 0,9987 \cdot x + 0,1383 \quad R^2 = 0,8287$$

El error cuadrático medio de la estimación, valor RMSEE (de Root Mean Square Error of Estimation) indica el ajuste de las observaciones al modelo (RMSE = 129.649). El error cuadrático medio RMSEcv es una medida análoga pero la estimación se realiza utilizando el procedimiento de validación cruzada (RMSEcv = 199.806).

En la Figura IV.77 se representa la dispersión de los pesos de las variables (*Loading Scatter Plot*). En este caso se ha tomado como variable respuesta los SMP medidos en el MBR-HS. En la Figura IV.78 se muestran los círculos de correlación obtenidos para la variable Y (SMP) con las variables X utilizadas en el modelo y las 15 observaciones.

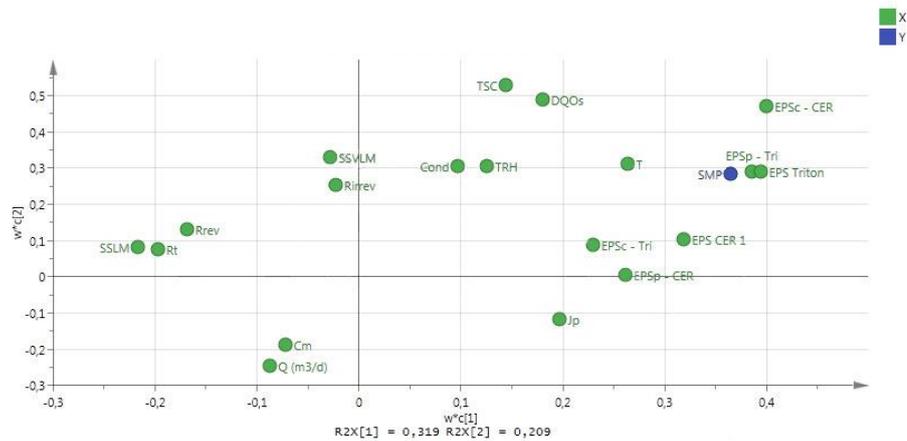


Figura IV.77: Dispersión de los pesos de la variable SMP del MBR-HS (*Loading Scatter Plot*)

Resultados y Discusión

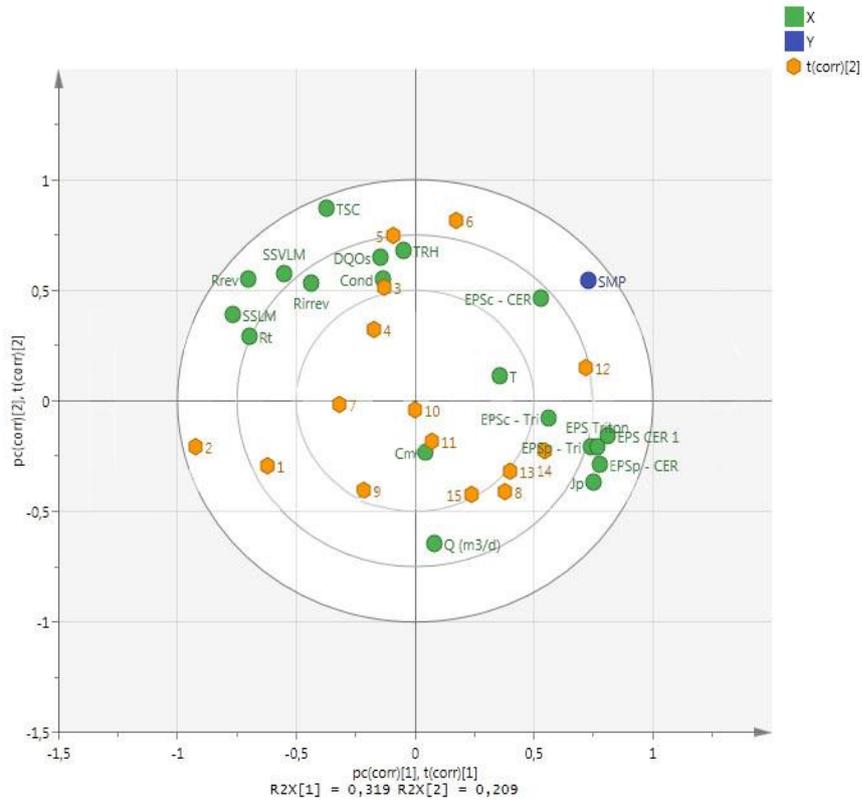


Figura IV.78: Biplot. Círculos de correlación obtenidos para la variable Y (SMP) con las X variables estudiadas y las 15 observaciones del MBR-HS

En el caso del MBR-HS el licor de mezcla es muy diferente del procedente del MBR-LS, ya que sus características están condicionadas por la elevada concentración de sólidos en suspensión en el lixiviado a tratar. La relación entre los SMP y los SSM y SSVLM es inversa, dado que una mayor concentración de los sólidos en el licor de mezcla es originada por una mayor concentración de sólidos en suspensión en la corriente de entrada del reactor. Este hecho hace que el porcentaje de microorganismos en el flóculo sea menor y, por tanto, sea menor la generación de SMP (el coeficiente de correlación de Pearson entre los sólidos en el lixiviado y los SMP es de -0.6964 con un p-value de 0.0371).

En este caso la relación de los SMP con el tiempo de succión capilar es inversa. Este hecho es debido a la concentración de sólidos en suspensión presentes en el lixiviado de entrada al MBR-HS que, al no ser biodegradables, forman parte del licor de mezcla. A mayor concentración de los mismos, los microorganismos presentes en el flóculo disminuyen y, por tanto, la generación de SMP. Es por ello que la pérdida de filtrabilidad está más influenciada por la presencia de sólidos en suspensión en el afluente, que por los SMP.

Esta correlación es opuesta a la encontrada en el MBR-LS, en el cual la concentración de sólidos en el lixiviado es menor, por lo que la influencia de los SMP en la filtrabilidad predomina sobre la influencia de los sólidos en suspensión presentes en el lixiviado.

Una vez explicada la relación entre la generación de SMP y el TSC, cabe comentar que el comportamiento de las resistencias a la filtración es análogo al del TSC, ya que ambos parámetros constituyen medidas de la filtrabilidad del licor de mezcla. De la misma forma la densidad de flujo de permeado varía inversamente proporcional al TSC y a las resistencias a la filtración.

Otra diferencia a resaltar entre ambos MBR es la influencia de la conductividad en la producción de SMP. Tal y como se ha explicado anteriormente, el aumento de conductividad provoca una mayor producción de SMP. De hecho los valores de SMP medidos en el MBR-HS son muy superiores a los del MBR-LS. Sin embargo, si nos centramos únicamente en los datos del MBR-HS no se observa esta tendencia. Esto puede ser debido a que a partir de un cierto umbral de conductividad los microorganismos siguen generando SMP debido al estrés bacteriano, pero no se ven influenciados por las pequeñas variaciones de conductividad, es decir en el MBR-LS la conductividad fluctúa entre 16.26 ± 6.97 mS/cm, en cambio en el MBR-HS la desviación es menor (40.13 ± 4.65 mS/cm).

7. ESTUDIO DEL ENSUCIAMIENTO DE LAS MEMBRANAS POR LAS PROTEÍNAS DE LAS eEPS

7.1. ESTUDIO CON PROTEÍNAS COMERCIALES

En un primer lugar, se han seleccionado cuatro proteínas sintéticas comerciales, representativas de las proteínas que se puede encontrar en las EPS de un licor de mezcla procedente de un MBR. Como proteínas modelo se han tomado: BSA, lisozima, hemoglobina y caseína. A partir de disoluciones de estas proteínas se ha determinado el punto isoeléctrico de las mismas y se ha evaluado la separación de proteínas del agua por precipitación utilizando sulfato amónico. Posteriormente, se realizarán los mismos ensayos con las EPS extraídas de muestras del licor de mezcla.

7.1.1. Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas

A continuación, en la Figura IV.79 se muestra el punto isoeléctrico obtenido a partir de la determinación del potencial zeta a diferentes valores de pH, de las cuatro disoluciones de proteínas sintéticas seleccionadas: BSA, lisozima, hemoglobina y caseína.

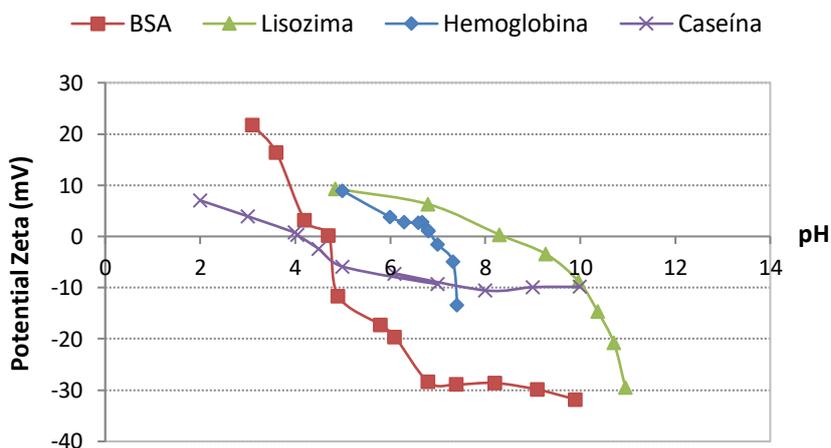


Figura IV.79: Punto isoeléctrico obtenido experimentalmente para las proteínas sintéticas

En la Tabla IV.19 se muestra el valor del punto isoeléctrico obtenido para las proteínas seleccionadas.

Tabla IV.19: Punto isoeléctrico experimental y peso molecular de las proteínas sintéticas

Proteína	Peso Molecular (Dalton)	Punto Isoeléctrico
BSA	66.430	4.7
Lisozima	14.307	8.3
Hemoglobina	64.500	6.8
Caseína	23.724	4.1

Cuando el pH es bajo, los grupos ionizables están protonados, y la carga neta de la proteína es de signo positivo. Cuando el pH es alto, los grupos ionizables están desprotonados, y la carga neta es de signo negativo. El punto isoeléctrico se encuentra entre ambas zonas y es el pH al cual la carga neta de la proteína es nula, siendo característico de cada proteína.

Se puede observar que los puntos isoeléctricos determinados variaron desde pH = 4,1 para la caseína hasta pH = 8,3 para la lisozima. Podemos afirmar que al pH en el que se encuentra el licor de mezcla de un MBR (entre 7 y 8,5), las proteínas estudiadas estarán cargadas negativamente excepto la lisozima. Esto podría ayudar al menor ensuciamiento de la membrana si la superficie de ésta poseyera igualmente un valor de potencial zeta negativo, lo que suele ser habitual en las membranas de UF. Concretamente, el potencial zeta de la membrana utilizada en los experimentos a un pH neutro es de -22 mV [59].

Resultados y Discusión

7.1.2. Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución de las proteínas sintéticas

En la Figura IV.80 se muestra la evolución de las intensidades relativas al medir por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución, las cuatro proteínas sintéticas.

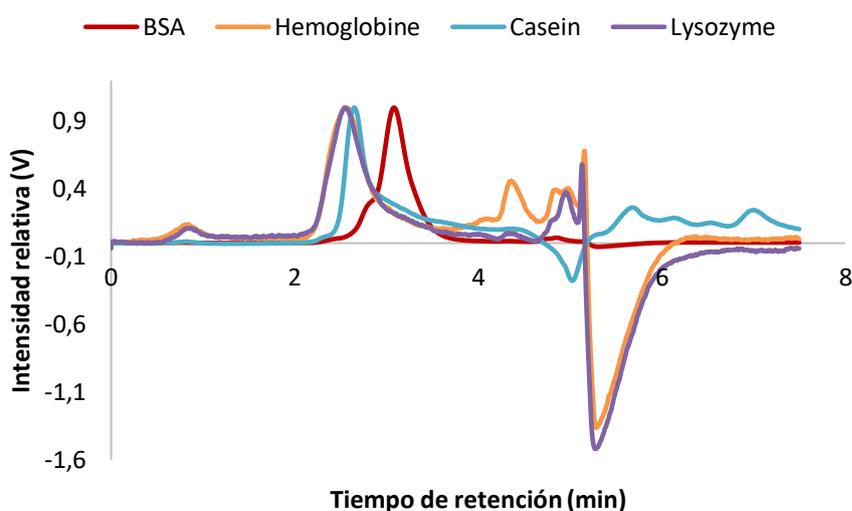


Figura IV.80: Evolución de la intensidad relativa al analizar las proteínas sintéticas en el HPSEC

Se observa que las cuatro proteínas presentan su mayor pico entre los 2.5 y 3.1 minutos. En la hemoglobina y lisozima se observa alrededor del minuto 5 un pico negativo, atribuible a desvíos de la línea base.

7.1.3. Concentración de proteínas sintéticas por precipitación mediante adición de sulfato amónico

En la Figura IV.81 se muestra la tendencia de la concentración de cada proteína sintética, a medida que se va adicionando sulfato amónico en la disolución. Como se puede observar, las concentraciones de proteínas van disminuyendo. Esto es debido a la precipitación que se produce de la

proteína como consecuencia del incremento de la fuerza iónica de la disolución causada por la adición del sulfato amónico. El incremento de la fuerza iónica hace disminuir la interacción entre las moléculas proteicas y las moléculas de agua favoreciendo la precipitación de las proteínas. Se emplea sulfato amónico porque aporta una elevada fuerza iónica y por su gran solubilidad (744 g/L a 20 °C). Como se observa, la denominada “precipitación salina” no es igual para todas las proteínas.

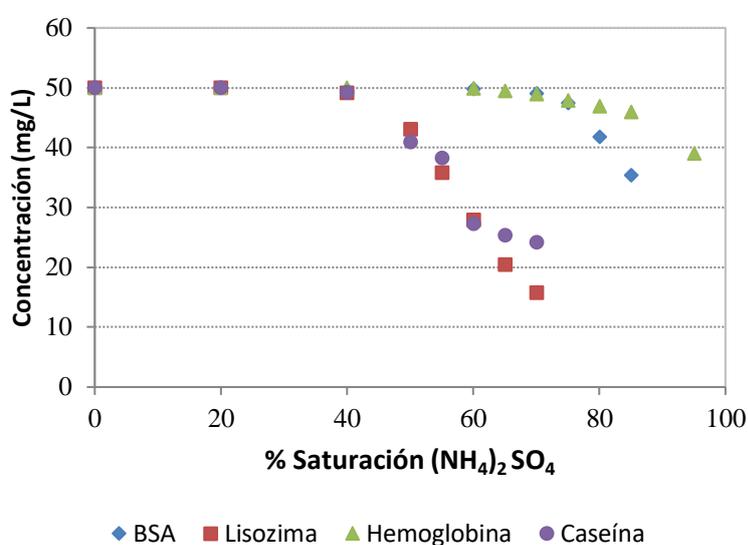


Figura IV.81: Efecto de la adición de sulfato amónico en la concentración de proteína sintética de cada disolución

De esta forma, se observa que cada una de las proteínas sintéticas empleadas precipita a un porcentaje de saturación de sulfato amónico distinto, siendo la caseína y la lisozima las proteínas que precipitan a menor dosis de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, coincidiendo con las proteínas de menor peso molecular. Al 85 % de saturación el porcentaje de precipitación de la lisozima y la caseína es elevado (68.57 % y 51.58 % respectivamente). En cambio, la hemoglobina apenas precipita (22.05 %) y el BSA presenta una precipitación cercana al 30 % con un porcentaje de saturación de sulfato amónico del 85 %.

Resultados y Discusión

A continuación en la Figura IV.82 se muestra el pellet que se forma en una de las purificaciones con sulfato amónico.

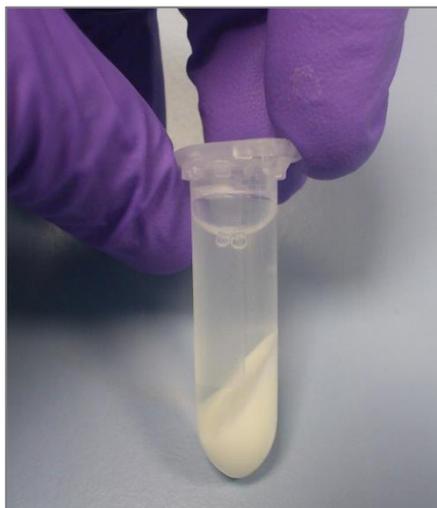


Figura IV.82: Pellet obtenido tras purificar proteína BSA sintética

7.2. ESTUDIO CON PROTEÍNAS PURIFICADAS DE LAS eEPS

7.2.1. *Determinación del punto isoeléctrico y comparación con proteínas sintéticas comerciales*

En la Figura IV.83 se muestra la influencia del pH en el potencial zeta de las proteínas extraídas del licor de mezcla, observándose el punto isoeléctrico obtenido en la muestra de eEPS y en la muestra de las eEPS purificadas con sulfato amónico.

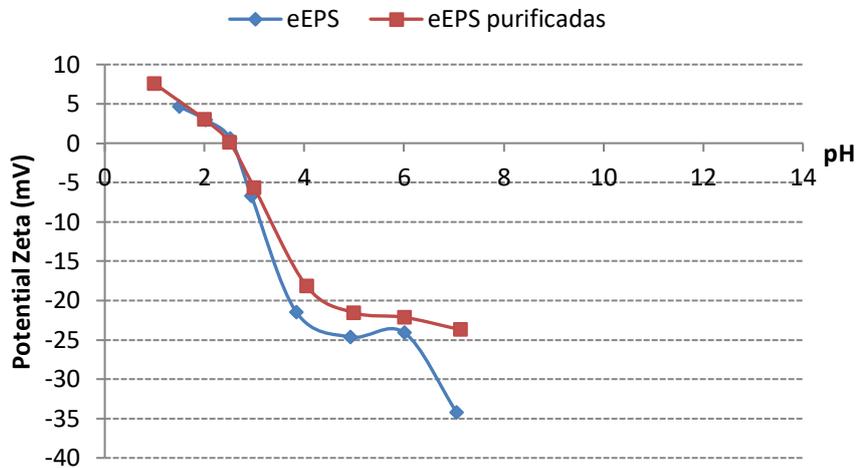


Figura IV.83: Potencial Zeta de las eEPS y de las eEPS extraídas y purificadas

Se observa que ambos puntos isoeléctricos coinciden, por lo que el fraccionamiento (o purificación) realizado por la precipitación salina no ha alterado apenas la carga de las proteínas. En otras palabras, las proteínas de las eEPS poseen las mismas características de carga que dichas proteínas purificadas por la adición de sulfato amónico. Comparando con las proteínas comerciales, cabe decir que el punto isoeléctrico es menor al de todas ellas. Sin embargo, los valores de potencial zeta en torno a la neutralidad son similares a los del BSA, proteína cuyo potencial zeta entre los valores de pH 7 y 8 estaba en torno a -30 mV. Cabe esperar por tanto, un comportamiento similar de las eEPS y del BSA en cuanto a sus propiedades de carga e interacción eléctrica con la superficie de la membrana.

Wang et al. (2009) analizaron el potencial zeta de la fracción soluble del licor de mezcla de un MBR y obtuvieron un valor de -35 mV a pH neutro [60]. Este valor es similar al obtenido en las eEPS a pH neutro (- 34.3 mV).

7.2.2. Determinación del ratio proteína/carbohidrato mediante tres métodos de extracción y purificación de proteínas por precipitación

Mediante la extracción de eEPS del licor de mezcla se pretende maximizar el ratio proteína/carbohidrato (P/C), ya que posteriormente se va a realizar una purificación de las proteínas con sulfato amónico e interesa tener la menor concentración de carbohidratos posible. Las proteínas separadas por precipitación serán utilizadas en los ensayos de ultrafiltración a diferentes valores de pH.

Dado que los carbohidratos son moléculas hidrófilas, no se espera que precipiten en el proceso de precipitación con sulfato de amonio [61]. De hecho, Park et al. (2008) obtuvieron que aproximadamente la mitad de los polisacáridos precipitados lo hicieron en fracciones de sulfato de amonio tempranas, por debajo de 20 - 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [61].

Para ello, se realizó un protocolo de extracción de eEPS en diferentes etapas, tal y como se recoge en el apartado 4.2 del capítulo de material y métodos. El objetivo era obtener la mayor cantidad de proteína posible.

En la Tabla IV.20 se muestra la concentración de proteínas y carbohidratos, así como el ratio P/C, de las eEPS procedentes de las tres etapas de extracción realizadas y de los pellets procedentes de la purificación de las proteínas de cada una de estas etapas.

Tabla IV.20: Concentración de proteínas y carbohidratos y ratio P/C, en las eEPS y en los pellets, procedentes de la purificación de las proteínas, de las 3 etapas de extracción

	C_{BSA} (mg/L)	C_{Glucosa} (mg/L)	Ratio P/C
eEPS etapa 1	888.32 ± 5.6	163.22 ± 33.5	5.44 ± 1.6
eEPS etapa 2	509.76 ± 12.1	98.20 ± 14.1	5.19 ± 1.1
eEPS etapa 3	42.00 ± 2.4	9.33 ± 7.1	4.50 ± 1.5
Pellet 1 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	384.72 ± 10.4	39.54 ± 2.4	9.73 ± 0.3
Pellet 2 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	80.71 ± 1.1	16.97 ± 4.2	4.76 ± 0.8
Pellet 3 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9.86 ± 0.1	6.17 ± 1.6	1.60 ± 0.3

Tras comprobar que en la etapa 1 se conseguía extraer la mayor cantidad de proteínas y que el ratio P/C obtenido era el mayor, tanto en las eEPS (sin purificar) como en las eEPS purificadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se decidió repetir esta extracción hasta conseguir la cantidad necesaria de eEPS para poder realizar los ensayos posteriores de ultrafiltración.

Los pellets obtenidos en las diferentes extracciones de eEPS se mezclaron, redisolieron y se purificaron. En total se obtuvieron $3410 \text{ mg}_{\text{BSA}}/\text{L}$ de proteína, con una concentración de carbohidratos de $317.7 \text{ mg}_{\text{Glucosa}}/\text{L}$, lo que implica un ratio P/C de 10.73. A partir de esta muestra se realizaron las diferentes diluciones para realizar los análisis y ensayos posteriores necesarios.

7.2.3. Caracterización de las SMP, eEPS y las proteínas purificadas de las eEPS mediante HPSEC. Comparación con proteínas sintéticas

En la Figura IV.84 se muestra la comparación del cromatograma obtenido con los SMP, eEPS y las proteínas purificadas de las eEPS. Se observa que los SMP coinciden con las eEPS y que al purificar las proteínas de las eEPS la curva se desplaza hacia la izquierda.

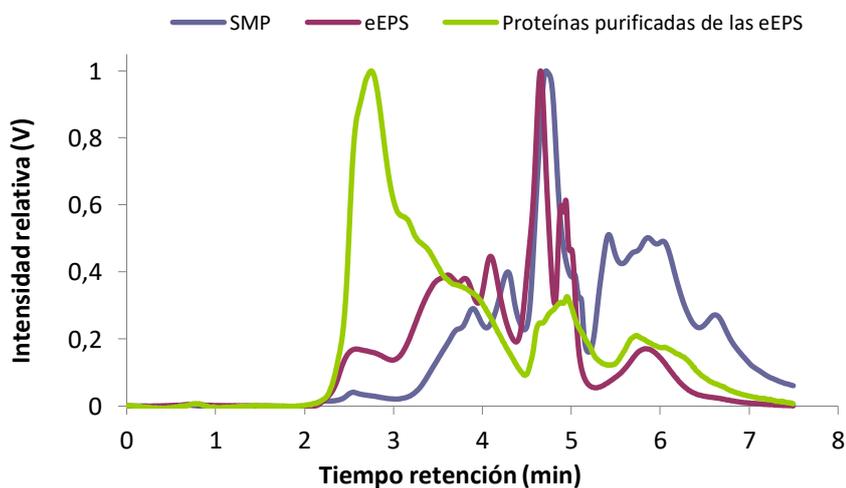


Figura IV.84: Evolución de la intensidad relativa al analizar las SMP, eEPS y las proteínas purificadas de las eEPS en el HPSEC

Resultados y Discusión

Comparando con el gráfico obtenido mediante cromatografía de exclusión por tamaño, HPSEC, al analizar las proteínas comerciales (Figura IV.80), se comprueba que las proteínas purificadas contienen un tamaño muy similar al de la proteína BSA. En la Figura IV.85 se presenta el cromatograma de ambas muestras (proteínas purificadas de las eEPS y BSA), en el que se observa la coincidencia de ambos picos en el minuto 3. No se ha encontrado similitud para el resto de proteínas comerciales.

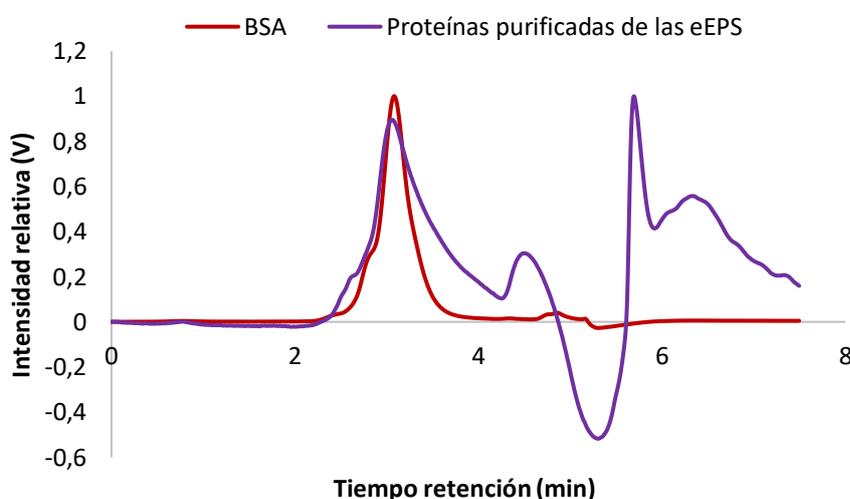


Figura IV.85: Evolución de la intensidad relativa al analizar las proteínas purificadas de las eEPS en el HPSEC y comparación con la proteína BSA

7.2.4. Espectro de excitación y emisión

Para la caracterización de las eEPS se realizaron también medidas del espectro de excitación-emisión con espectroscopia de fluorescencia. Esta técnica permite conocer la composición química de las EPS.

De acuerdo con la clasificación realizada por Chen et al. (2003), que es la más ampliamente utilizada en bibliografía, la matriz de excitación-emisión se divide en cinco regiones, asociándose los picos a compuestos orgánicos de tipo húmico, tipo tirosina, tipo triptófano o fenol [62]. Los picos asociados a longitudes de onda de excitación cortas (< 250 nm) y

longitudes de onda de emisión cortas (<350nm) están relacionados con proteínas aromáticas simples como la tirosina (regiones I y II). Los picos con longitudes de onda de excitación cortas (<250 nm) y longitudes de onda de emisión altas (> 350 nm) están relacionados con materiales similares a ácidos fúlvicos (región III). Los picos con longitudes de onda de excitación intermedias (250-280 nm) y longitudes de onda de emisión cortas (<380 nm), están relacionados con productos solubles microbianos (región IV). Finalmente, los picos con longitudes de onda de excitación altas (> 280 nm) y longitudes de onda de emisión altas (> 380 nm) están relacionados con compuestos orgánicos tipo ácido húmico (región V).

En la Figura IV.86 se muestra el espectro de excitación/emisión de las eEPS. La barra de la derecha indica la intensidad.

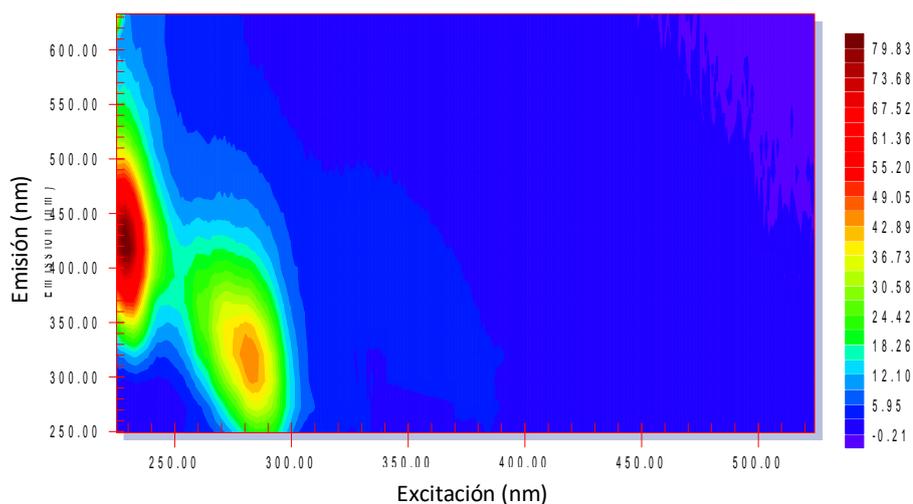


Figura IV.86: Espectro de fluorescencia excitación-emisión de las eEPS

Tal y como se observa en la Figura IV.86, se observan 2 picos. El primero de ellos se encuentra a las longitudes de onda de excitación-emisión de 230/430 nm y el segundo de ellos a 285/320 nm. De acuerdo con la clasificación realizada por Chen et al. (2003) [62], el primer pico se encuentran entre la región II (proteínas aromáticas) y la región III (ácidos

Resultados y Discusión

fúlvicos). El segundo pico se encuentra en la región IV (productos solubles microbianos). Wang et al. (2012) analizaron el espectro de excitación-emisión de la fracción soluble del licor de mezcla de un MBR y determinaron que el pico Excitación/Emisión a 280/320 nm correspondía con sustancias proteicas, específicamente proteínas tipo triptófano [63].

7.2.5. Ensayos de UF con disoluciones de las proteínas purificadas de las eEPS

Una vez extraídas las eEPS del licor de mezcla, y haber realizado la purificación de las proteínas presentes en las eEPS con el sulfato amónico, se prepararon diferentes disoluciones de 50 mg/L de proteína para realizar los ensayos de ultrafiltración que a continuación se muestran. Todas las disoluciones de proteína purificada de las eEPS se prepararon a partir de la misma muestra. En la Figura IV.87 se muestra la evolución de la presión transmembranal (PTM) durante el periodo de filtración de las disoluciones preparadas con las proteínas purificadas de las eEPS, a diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6, 7 y 9), fijando en todos los casos una densidad de flujo de permeado constante de 20 L/m²·h.

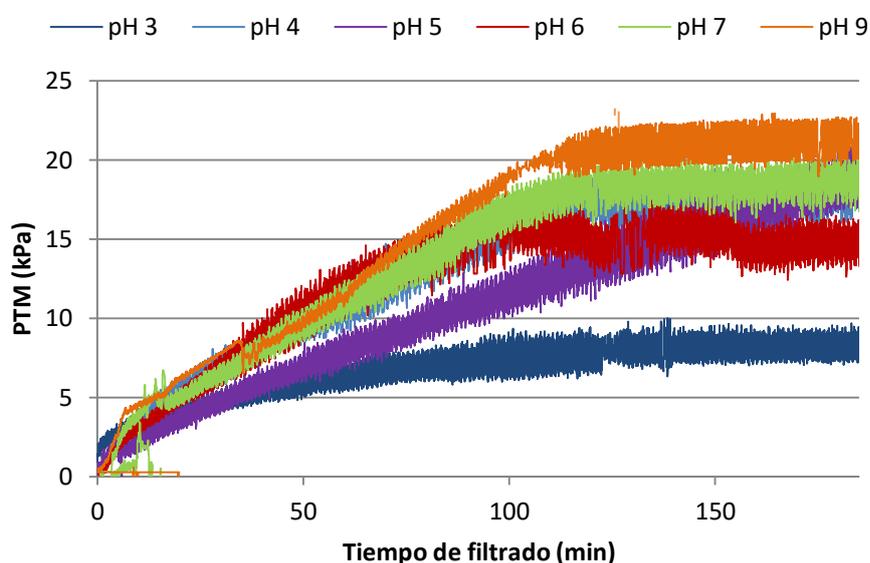


Figura IV.87: Evolución de la presión transmembranal usando como alimento disoluciones de proteína purificada, a diferentes valores de pH

Tal y como se observa en la Figura IV.87, en términos generales a medida que el pH aumenta, el aumento de la presión transmembranal para conseguir el mismo flujo de permeado es mayor, lo que significa que el ensuciamiento de la membrana incrementa. De este modo, el pH 3 es el que menor ensuciamiento de la membrana causa, seguido de pH 5. Los pH 4 y 6 tienen un comportamiento similar. Y los pH 7 y 9 son los que mayor ensuciamiento provocan.

A valores de pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, la carga neta de la proteína es positiva, y a valores de pH por encima del punto isoeléctrico, la carga neta es negativa.

En la Figura IV.88 muestran los valores de rechazo de la membrana a las proteínas obtenidos al ultrafiltrar las disoluciones de 50 mg/L de proteína purificada a partir de las eEPS. Los ensayos de ultrafiltración se han realizado a diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6, 7 y 9). Cabe indicar que las proteínas de las disoluciones se han medido como proteína BSA, dado que, como se ha explicado antes, la proteína BSA es la que mejor identifica a las proteínas de las eEPS.

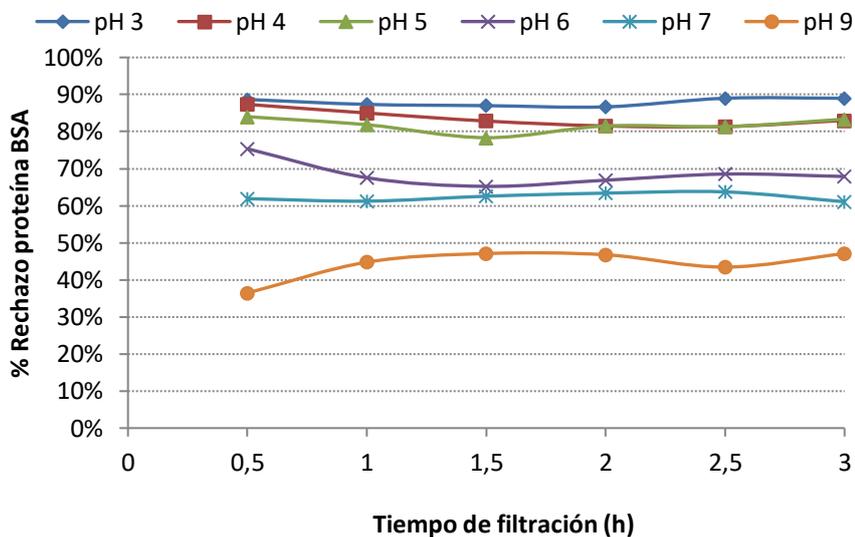


Figura IV.88: Evolución del rechazo de la membrana de ultrafiltración a las proteínas usando como alimento disoluciones de proteína purificada a diferentes valores de pH

Resultados y Discusión

El menor porcentaje de rechazo de proteína se obtuvo para pH 9 (entre 36.4 y 47 %) y el mayor para pH 3 (entre 86.6 y 89%). Para valores de pH 5, el porcentaje de rechazo de proteína fue entre 78 y 84 %. Los datos de rechazo nos pueden ayudar a explicar por qué había mayor ensuciamiento a pH = 9. Como se ha comentado, a ese valor de pH el rechazo es el menor, es decir, el paso de proteínas a través de la membrana es considerable, pudiendo obstruirse los poros de la membrana ya que las moléculas proteicas son capaces de penetrar a través de los mismos. El fenómeno contrario sucede a valores de pH = 3. Las proteínas no penetran a través de los poros y la velocidad tangencial de la alimentación hace que el ensuciamiento en la superficie de la membrana sea menor.

7.2.6. Influencia de la adición de alginato de sodio, en las disoluciones de proteínas de los eEPS purificadas, en los ensayos de UF

En primer lugar se realizó una valoración turbidimétrica con el fin de evaluar el comportamiento de la formación de complejos en sistemas binarios (proteína-carbohidrato). Para ello, se partió de una mezcla de 50 mg/L de proteína purificada de las eEPS junto con 50 mg/L de alginato de sodio. En la Figura IV.89 se presentan los resultados obtenidos.

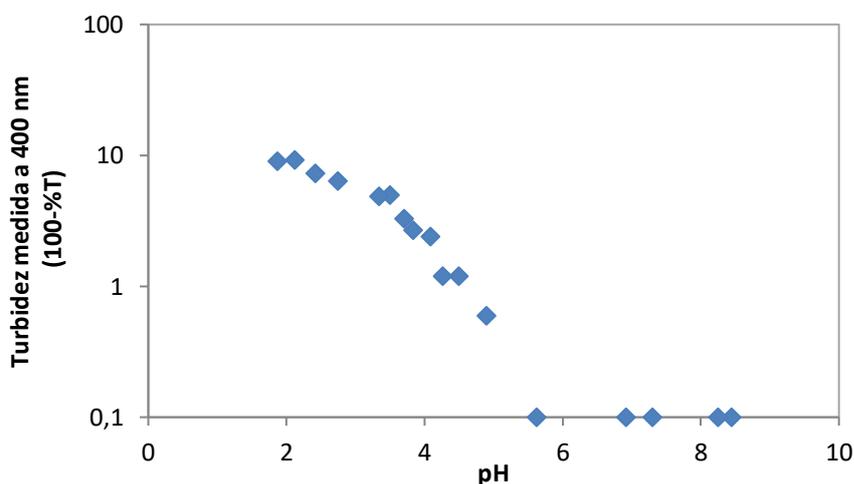


Figura IV.89: Valoración turbidimétrica para sistema binario formado por la mezcla de 50 mg/L de proteína purificada de las eEPS junto con 50 mg/L de alginato de sodio

Si se parte de un pH básico (8.3), se obtiene un valor de transmitancia a 400 nm del 100%. Si se reduce progresivamente el pH este comportamiento se mantiene, de forma que a partir de pH 5.6 se observa una disminución de la transmitancia. El valor de pH correspondiente a este aumento inicial de la turbidez se define como el pH crítico (pH_c) y corresponde al inicio de la formación de complejos solubles. A partir de este valor la transmitancia de las muestras disminuyó exponencialmente comenzando a formarse también complejos de carácter insoluble entre el BSA y el alginato de sodio. Neeman et al. (2013) determinaron siempre valores alrededor de 6 para el pH_c empleando una mezcla binaria BSA-alginato de sodio con diferentes concentraciones de ambos compuestos siempre en una relación 1:1 [59].

Para estudiar la influencia de los carbohidratos junto con las proteínas en el ensuciamiento de la membrana, se adicionaron 50 mg/L de alginato de sodio a 50 mg/L de la disolución de proteínas previamente purificadas a partir de las eEPS del licor de mezcla. En la Figura IV.90 se muestra la evolución de la presión transmembranal (PTM) durante el periodo de filtración de las proteínas purificadas de las eEPS, a diferentes pH (3, 4, 5, 6 y 9), fijando en todos los casos una densidad de flujo de permeado constante de 20 L/m²·h.

Resultados y Discusión

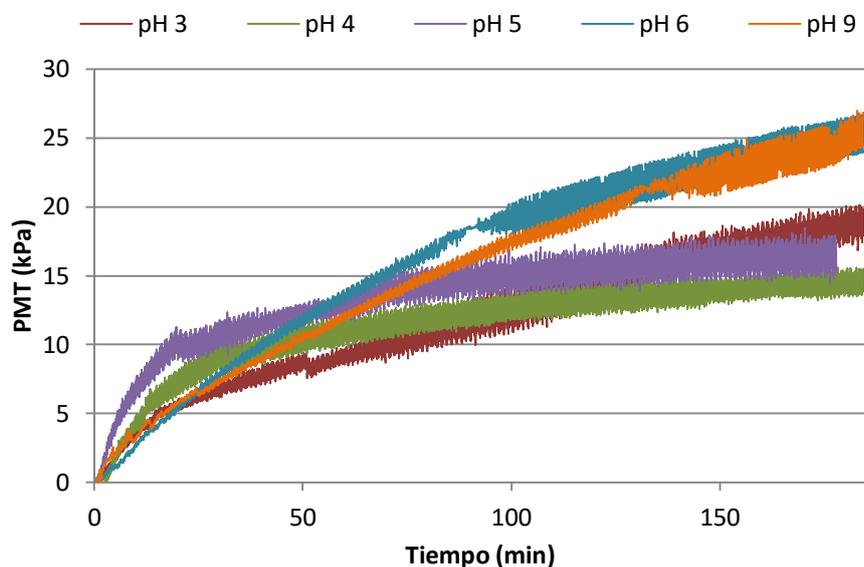


Figura IV.90: Evolución de la presión transmembranal usando como alimento disoluciones de proteína purificada + alginato de sodio a diferentes valores de pH

En la Figura IV.90 se observa que al adicionar el alginato de sodio la influencia del pH sobre el ensuciamiento de la membrana apenas varía respecto al ensuciamiento en los ensayos de ultrafiltración con la proteína purificada sin adicionar alginato, siendo los valores de pH 6 y 9 los que mayor ensuciamiento provocan. En cuanto al ensuciamiento, este sigue siendo menor a valores de pH ácidos. La formación de complejos carbohidrato-proteína hace que estos compuestos no penetren en los poros, justificándose así el menor ensuciamiento de la membrana. Sin embargo, si se comparan los valores estacionarios de presión transmembranal de los ensayos sin y con alginato de sodio (Figura IV.87 y Figura IV.90), se observa que la adición de alginato de sodio aumenta el ensuciamiento de la membrana. Ello es debido al carácter hidrófilo de los carbohidratos tal y como se ha explicado anteriormente.

En la Figura IV.91 se muestran los valores de rechazo de la membrana a las proteínas al ultrafiltrar la disolución de 50 mg/L de proteína purificada a partir de las eEPS junto con 50 mg/L de alginato de sodio. Los ensayos de ultrafiltración se han realizado a diferentes valores de pH (3, 4, 5 y 9).

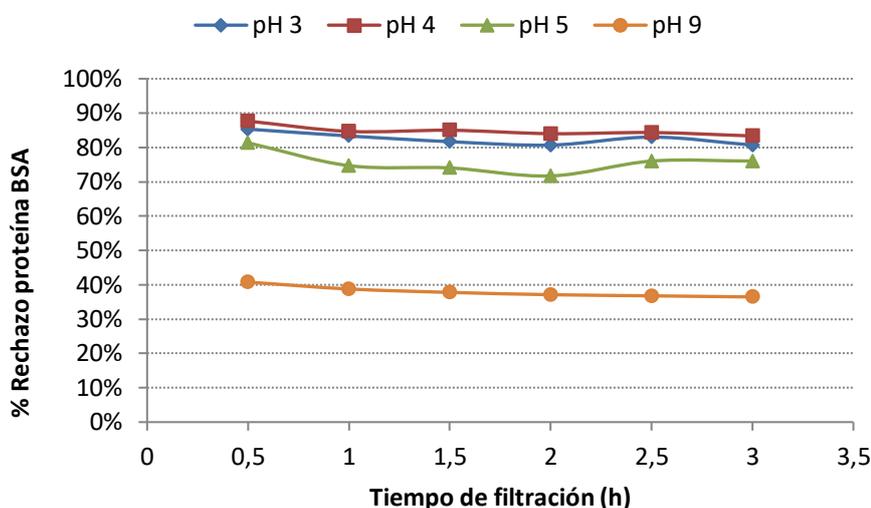


Figura IV.91: Evolución del rechazo de la membrana de ultrafiltración a las proteínas usando como alimento disoluciones de proteína purificada + alginato de sodio a diferentes valores de pH

Tal y como se observa en la Figura IV.91 el menor porcentaje de rechazo de proteína se obtuvo para pH 9 (entre 36.5 y 40.7%), al igual que en los ensayos únicamente con proteína.

Del mismo modo, el mayor porcentaje de rechazo se obtuvo para pH 3 (entre 80.7 y 85.3%) y 4 (entre 83.3 y 87.6%). Para valores de pH 5, el porcentaje de rechazo de proteína fue entre 71.7 y 81%.

Comparando las muestras de proteína purificada con las de la proteína purificada con adición de alginato de sodio (Figura IV.88 y Figura IV.91, respectivamente), se observa que el rechazo disminuye ligeramente al adicionar el alginato de sodio a la disolución. Esto es probablemente debido a la acumulación de proteínas sobre la superficie de la membrana por el efecto adherente de los carbohidratos, que hace que manteniéndose el rechazo real de la membrana, se determinen mayores concentraciones de proteína, medida como BSA, en el permeado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Ras, E. Girbal-Neuhauser, E. Paul, M. Spérandio, D. Lefebvre, Protein extraction from activated sludge: an analytical approach., *Water Res.* 42 (2008) 1867–78.
- [2] R. Monique, G.N. Elisabeth, P. Etienne, L. Dominique, A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 7464–7471.
- [3] L. Domínguez, M. Rodríguez, D. Prats, Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges Part II: Influence of extraction methods over molecular weight distribution, *Desalination.* 262 (2010) 106–109.
- [4] S. Comte, G. Guibaud, M. Baudu, Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 237–245.
- [5] Y. Shi, J. Huang, G. Zeng, Y. Gu, Y. Chen, Y. Hu, B. Tang, J. Zhou, Y. Yang, L. Shi, Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview, *Chemosphere.* 180 (2017) 396–411.
- [6] H. Lin, M. Zhang, F. Wang, F. Meng, B.-Q. Liao, H. Hong, J. Chen, W. Gao, A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies, *J. Memb. Sci.* 460 (2014) 110–125.
- [7] J. Jimenez, F. Vedrenne, C. Denis, A. Mottet, S. Déléris, J.P. Steyer, J.A. Cacho Rivero, A statistical comparison of protein and carbohydrate characterisation methodology applied on sewage sludge samples, *Water Res.* 47 (2013) 1751–1762.
- [8] J.E. Noble, M.J.A. Bailey, Chapter 8 Quantitation of Protein, 1st ed., Elsevier Inc., 2009.
- [9] G. Sheng, H. Yu, X. Li, Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 882–894.
- [10] B. Frølund, R. Palmgren, K. Keiding, P.H. Nielsen, Extraction of extracellular

- polymers from activated sludge using a cation exchange resin, *Water Res.* 30 (1996) 1749–1758.
- [11] H. Liu, H.H.P. Fang, Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges, *J. Biotechnol.* 95 (2002) 249–256.
- [12] L. Dvořák, M. Gómez, M. Dvořáková, I. Růžičková, J. Wanner, The impact of different operating conditions on membrane fouling and EPS production., *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 6870–5.
- [13] Y. Liu, H.H.P. Fang, Influences of Extracellular Polymeric Substances (EPS) on Flocculation, Settling, and Dewatering of Activated Sludge, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 33 (2003) 237–273.
- [14] S. Judd, *The MBR Book. Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment*, 2nd Editio, Elsevier, 2011.
- [15] N. Triantafillopoulos, *Measurement of Fluid Rheology and Interpretation of Rheograms*, 2nd ed., Kaltec Scientific, Inc., 2000.
- [16] N. Ratkovich, W. Horn, F.P. Helmus, S. Rosenberger, W. Naessens, I. Nopens, T.R. Bentzen, Activated sludge rheology: A critical review on data collection and modelling, *Water Res.* 47 (2013) 463–482.
- [17] F.M. White, *Mecánica de Fluidos*, 6th ed., Mc Graw Hill, 2008.
- [18] T. Itonaga, K. Kimura, Y. Watanabe, Influence of suspension viscosity and colloidal particles on permeability of membrane used in membrane bioreactor (MBR), *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 301–309.
- [19] N. Eshtiaghi, F. Markis, S.D. Yap, J.C. Baudez, P. Slatter, Rheological characterisation of municipal sludge: A review, *Water Res.* 47 (2013) 5493–5510.
- [20] A. Pollice, C. Giordano, G. Laera, D. Saturno, G. Mininni, Physical characteristics of the sludge in a complete retention membrane bioreactor, *Water Res.* 41 (2007) 1832–1840.
- [21] J. Lee, W.Y. Ahn, C.H. Lee, Comparison of the filtration characteristics between attached and suspended growth microorganisms in submerged membrane bioreactor, *Water Res.* 35 (2001) 2435–2445.
- [22] H.-F. Zhang, Impact of Soluble Microbial Products and Extracellular

Resultados y Discusión

- Polymeric Substances on Filtration Resistance in a Membrane Bioreactor, *Environ. Eng. Sci.* 26 (2009) 1115–1122.
- [23] F. Meng, H. Zhang, F. Yang, S. Zhang, Y. Li, X. Zhang, Identification of activated sludge properties affecting membrane fouling in submerged membrane bioreactors, *Sep. Purif. Technol.* 51 (2006) 95–103.
- [24] J. Li, F. Yang, Y. Li, F.S. Wong, H.C. Chua, Impact of biological constituents and properties of activated sludge on membrane fouling in a novel submerged membrane bioreactor, *Desalination*. 225 (2008) 356–365.
- [25] R. Van den Broeck, P. Krzeminski, J. Van Dierdonck, G. Gins, M. Lousada-Ferreira, J.F.M. Van Impe, J.H.J.M. van der Graaf, I.Y. Smets, J.B. van Lier, Van den Broeck, R., Krzeminski, P., Van Dierdonck, J., Gins, G., Lousada-Ferreira, M., Van Impe, J.F.M., van der Graaf, J.H.J.M., Smets, I.Y., van Lier, J.B., 2011. Activated sludge characteristics affecting sludge filterability in municipal and industria, *J. Memb. Sci.* 378 (2011) 330–338.
- [26] F. Meng, B. Shi, F. Yang, H. Zhang, New insights into membrane fouling in submerged membrane bioreactor based on rheology and hydrodynamics concepts, *J. Memb. Sci.* 302 (2007) 87–94.
- [27] A. Cosenza, G. Di Bella, G. Mannina, M. Torregrossa, The role of EPS in fouling and foaming phenomena for a membrane bioreactor, *Bioresour. Technol.* 147 (2013) 184–192.
- [28] E. Reid, X. Liu, S.J. Judd, Sludge characteristics and membrane fouling in full-scale submerged membrane bioreactors, *Desalination*. 219 (2008) 240–249.
- [29] A. Drews, M. Vocks, U. Bracklow, V. Iversen, M. Kraume, Does fouling in MBRs depend on SMP?, *Desalination*. 231 (2008) 141–149.
- [30] Z. Wu, Z. Wang, Z. Zhou, G. Yu, G. Gu, Sludge rheological and physiological characteristics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor, *Desalination*. 212 (2007) 152–164.
- [31] H.Y. Ng, T.W. Tan, S.L. Ong, Membrane fouling of submerged membrane bioreactors: Impact of mean cell residence time and the contributing factors, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2706–2713.
- [32] L. Jin, S.L. Ong, H.Y. Ng, Comparison of fouling characteristics in different pore-sized submerged ceramic membrane bioreactors, *Water Res.* 44 (2010) 5907–5918.

- [33] M. Lousada-Ferreira, J.B. van Lier, J.H.J.M. van der Graaf, Impact of suspended solids concentration on sludge filterability in full-scale membrane bioreactors, *J. Memb. Sci.* 476 (2015) 68–75.
- [34] J.R. Pan, Y.C. Su, C. Huang, H.C. Lee, Effect of sludge characteristics on membrane fouling in membrane bioreactors, *J. Memb. Sci.* 349 (2010) 287–294.
- [35] X. Huang, R. Liu, Y. Qian, Behaviour of soluble microbial products in a membrane bioreactor, *Process Biochem.* 36 (2000) 401–406.
- [36] B.P. Frank, G. Belfort, Polysaccharides and sticky membrane surfaces: Critical ionic effects, *J. Memb. Sci.* 212 (2003) 205–212.
- [37] I. Bourven, S. Simon, D. Bhatia, E.D. van Hullebusch, G. Guibaud, Effect of various size exclusion chromatography (SEC) columns on the fingerprints of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from biological sludge, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 49 (2015) 148–155.
- [38] O. Nosyk, E. ter Haseborg, U. Metzger, F.H. Frimmel, A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization, *J. Microbiol. Methods.* 75 (2008) 449–456.
- [39] L. Borrás, Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de València, 2008.
- [40] F.Y. Sun, X.M. Wang, X.Y. Li, Visualisation and characterisation of biopolymer clusters in a submerged membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 325 (2008) 691–697.
- [41] D.M. Dominiak, J.L. Nielsen, P.H. Nielsen, Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms, *Environ. Microbiol.* 13 (2011) 710–721.
- [42] X. Hao, Q. Wang, Y. Cao, M.C.M. van Loosdrecht, Measuring the activities of higher organisms in activated sludge by means of mechanical shearing pretreatment and oxygen uptake rate., *Water Res.* 44 (2010) 3993–4001.
- [43] D. Jang, Y. Hwang, H. Shin, W. Lee, Effects of salinity on the characteristics of biomass and membrane fouling in membrane bioreactors, *Bioresour. Technol.* 141 (2013) 50–56.
- [44] G. Di Bella, D. Di Trapani, M. Torregrossa, G. Viviani, Performance of a MBR

Resultados y Discusión

pilot plant treating high strength wastewater subject to salinity increase: Analysis of biomass activity and fouling behaviour, *Bioresour. Technol.* 147 (2013) 614–618.

- [45] S. Sanguanpak, C. Chiemchaisri, W. Chiemchaisri, K. Yamamoto, Influence of operating pH on biodegradation performance and fouling propensity in membrane bioreactors for landfill leachate treatment, *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 102 (2015) 64–72.
- [46] G. Sabia, M. Ferraris, A. Spagni, Effect of solid retention time on sludge filterability and biomass activity: Long-term experiment on a pilot-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater, *Chem. Eng. J.* 221 (2013) 176–184.
- [47] C. Kragelund, C. Levantesi, A. Borger, K. Thelen, D. Eikelboom, V. Tandoi, Y. Kong, J. Krooneman, P. Larsen, T.R. Thomsen, P.H. Nielsen, Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to the Bacteroidetes present in activated sludge plants, *Microbiology.* 154 (2008) 886–894.
- [48] E. Zuriaga-Agustí, J.A. Mendoza-Roca, A. Bes-Piá, J.L. Alonso-Molina, F. Muñagorri-Mañueco, G. Ortiz-Villalobos, E. Fernández-Giménez, Comparison between mixed liquors of two side-stream membrane bioreactors treating wastewaters from waste management plants with high and low solids anaerobic digestion, *Water Res.* 100 (2016) 517–525.
- [49] A. Drews, Membrane fouling in membrane bioreactors—Characterisation, contradictions, cause and cures, *J. Memb. Sci.* 363 (2010) 1–28.
- [50] A.A. Moreau, N. Ratkovich, I. Nopens, J.H.J.M. van der Graaf, The (in)significance of apparent viscosity in full-scale municipal membrane bioreactors, *J. Memb. Sci.* 340 (2009) 249–256.
- [51] M.S. Camilleri-Rumbau, B. Norddahl, J. Wei, K.V. Christensen, L.F. Søjtoft, Microfiltration and ultrafiltration as a post-treatment of biogas plant digestates for producing concentrated fertilizers, *Desalin. Water Treat.* 55 (2014) 1639–1653.
- [52] F. Meng, B. Shi, F. Yang, H. Zhang, Effect of hydraulic retention time on membrane fouling and biomass characteristics in submerged membrane bioreactors, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 30 (2007) 359–367.
- [53] F. Meng, S.R. Chae, A. Drews, M. Kraume, H.S. Shin, F. Yang, Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and

- membrane material, *Water Res.* 43 (2009) 1489–1512.
- [54] D.D. Sun, C.T. Hay, S.L. Khor, Effects of hydraulic retention time on behavior of start-up submerged membrane bioreactor with prolonged sludge retention time, *Desalination*. 195 (2006) 209–225.
- [55] E. Reid, X. Liu, S.J. Judd, Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor, *J. Memb. Sci.* 283 (2006) 164–171.
- [56] W. Luo, F.I. Hai, J. Kang, W.E. Price, W. Guo, H.H. Ngo, K. Yamamoto, L.D. Nghiem, Effects of salinity build-up on biomass characteristics and trace organic chemical removal: Implications on the development of high retention membrane bioreactors, *Bioresour. Technol.* 177 (2015) 274–281.
- [57] A. Drews, J. Mante, V. Iversen, M. Vocks, B. Lesjean, M. Kraume, Impact of ambient conditions on SMP elimination and rejection in MBRs, *Water Res.* 41 (2007) 3850–3858.
- [58] W.C.L. Lay, Y. Liu, A.G. Fane, Impacts of salinity on the performance of high retention membrane bioreactors for water reclamation: A review, *Water Res.* 44 (2010) 21–40.
- [59] F. Neemann, S. Rosenberger, B. Jefferson, E.J. McAdam, Non-covalent protein-polysaccharide interactions and their influence on membrane fouling, *J. Memb. Sci.* 446 (2013) 310–317.
- [60] X.M. Wang, T.D. Waite, Role of gelling soluble and colloidal microbial products in membrane fouling, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9341–9347.
- [61] C. Park, J.T. Novak, R.F. Helm, Y.O. Ahn, A. Esen, Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges, *Water Res.* 42 (2008) 3879–3889.
- [62] W. Chen, P. Westerhoff, J.A. Leenheer, K. Booksh, Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5701–5710.
- [63] Z. Wang, X. Mei, Z. Wu, S. Ye, D. Yang, Effects of biopolymer discharge from MBR mixture on sludge characteristics and membrane fouling, *Chem. Eng. J.* 193–194 (2012) 77–87.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

En esta Tesis Doctoral se corrobora la importancia de la caracterización de las eEPS y SMP para evaluar el proceso llevado a cabo en un MBR, ya que estas sustancias están relacionadas con las características físicas del licor de mezcla.

De los ensayos preliminares, se concluye que:

- Los métodos de extracción de eEPS más eficientes, ocasionando una mínima ruptura celular, son el método que utiliza la resina de intercambio catiónico (CER) y el método que utiliza el tensioactivo Triton X-100.
- El método de adición estándar empleado permitió la detección de interferencias entre el método de extracción Triton X-100 y el de análisis de carbohidratos mediante Antrona. No se detectaron interferencias entre los otros métodos de extracción y análisis de proteínas y carbohidratos.
- Los métodos de análisis seleccionados para las eEPS fueron: en el caso de las proteínas el método con ácido bicinconínico (BCA) y, en el de los carbohidratos, el método de Dubois cuando la extracción se realizaba con Triton X-100 y el método con Antrona cuando la extracción se realizaba con la resina. En el caso de los SMP, los métodos de análisis seleccionados fueron el micro BCA para las proteínas y el de Antrona para los carbohidratos.

En los ensayos de caracterización del licor de mezcla del MBR que trata aguas residuales urbanas se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Los SMP determinados en las muestras analizadas tienen un valor promedio de 39.1 mg/L, pudiendo afirmarse que la concentración de proteína fue superior a la de carbohidratos, siendo aproximadamente el 50 % mayor. Las concentraciones de ADN medidas fueron muy bajas, mostrando una escasa lisis celular. Este hecho se corrobora con altos porcentajes de células viables observados en el microscopio de epifluorescencia.

Conclusiones

- De los tres métodos de extracción de eEPS comparados, el método Triton X-100 fue el que más eEPS extrajo, obteniendo un valor medio de 92.2 mg/gSV. No se observó una variabilidad significativa en la concentración de eEPS a lo largo de todas las experiencias.
- Los EPS extraídos (eEPS) estuvieron igualmente constituidos por mayores concentraciones de proteínas que de carbohidratos. El valor medio de la relación proteínas/carbohidratos osciló entre 4 y 7.8, siendo el método CER 1 el que mayor ratio obtuvo.
- Los valores de ADN medidos en las eEPS indican que los métodos de extracción se llevaron a cabo sin provocar la ruptura de la membrana celular.
- Los ensayos reológicos llevados a cabo en el licor de mezcla indican que éste tiene un comportamiento no-Newtoniano y no tixotrópico. Se observó que la viscosidad aumentaba con la concentración de sólidos en suspensión en el licor de mezcla (SSLM), siendo la concentración de 8.4 g/L la concentración crítica a partir de la cual el aumento de viscosidad crecía exponencialmente. Por debajo de esta concentración el aumento observado fue muy bajo.
- Los resultados de las resistencias a la filtración del licor de mezcla indicaron un mayor porcentaje de resistencia reversible que irreversible. Por consiguiente, el ensuciamiento de la membrana se debe principalmente a la formación de torta.
- No se encontró relación entre las concentraciones de SSLM y las resistencias a la filtración. Por consiguiente, la densidad de flujo de permeado no mostró relación con la concentración de SSLM, dentro del rango de valores medidos.
- Las proteínas de los SMP se correlacionaron de forma directa con la resistencia reversible a la filtración de la membrana. Sin embargo, las bajas concentraciones de carbohidratos medidos en los SMP no permitieron encontrar una correlación de éstos con el ensuciamiento de la membrana.
- Se observó un ligero aumento del ensuciamiento de la membrana, tanto reversible como irreversible, con la concentración de eEPS. La

correlación obtenida fue mejor en el caso de las eEPS extraídas mediante los métodos con la resina de intercambio catiónico.

- El tiempo de succión capilar es una medida de la filtrabilidad del licor de mezcla. Este parámetro aumentó su valor al aumentar la concentración de SSLM y la viscosidad del fango. Se observó igualmente una relación directa entre el tiempo de succión capilar y la concentración de carbohidratos en los SMP.
- La distribución del tamaño de partículas apenas varió en las muestras analizadas, siendo el promedio del diámetro medio en volumen (D [4,3]) de 47,5 μm .
- De la observación al microscopio óptico se desprende que el licor de mezcla del MBR urbano presenta una estructura abierta y compacta, con presencia de rotíferos y anélidos, característicos de altas edades del fango.
- La tinción del método de Nosyk resultó ser la más adecuada para la caracterización de las eEPS mediante microscopía de epifluorescencia. Los resultados obtenidos por esta técnica, muestran al igual que los métodos de extracción químicos, una mayor concentración de proteínas que de carbohidratos. Sin embargo, la cuantificación de las concentraciones de proteínas y carbohidratos no es posible mediante esta técnica.

En los ensayos de caracterización del licor de mezcla de los MBR que tratan lixiviados de plantas de tratamiento de residuos orgánicos municipales, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Las características de las aguas residuales afluentes a ambos MBR estudiados, fueron muy diferentes debido al proceso previo llevado a cabo en las plantas de tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU). En concreto, el lixiviado (afluente) procedente de la planta que emplea una digestión anaerobia en vía seca (tratada en el MBR-HS) posee una mayor conductividad, concentración de sólidos y DQO, que la planta que emplea una digestión húmeda (tratada en el MBR-LS). Las

Conclusiones

características de estos lixiviados influyeron en las propiedades físico-químicas de los licores de mezcla.

- Los SMP medidos en ambos MBR fueron muy superiores a los medidos en el MBR urbano. Las mayores concentraciones se registraron en el MBR-HS, siendo su valor promedio de 1400 mg/L. Ello es debido a las altas conductividades y concentraciones de DQO no biodegradable de los afluentes tratados, lo que produce un estrés bacteriano muy elevado. Al igual que en el MBR urbano, la concentración de proteínas en ambos MBR fue mucho mayor que la de carbohidratos (ratio P/C en el MBR-LS y MBR-HS de 4.59 y 3.58, respectivamente).
- A diferencia de los SMP, las eEPS fueron similares en los tres MBR estudiados, conservándose un ratio P/C elevado. Sin embargo, su comparación es más complicada puesto que los sólidos en suspensión volátiles están formados tanto por microorganismos como por materia orgánica no biodegradable del lixiviado a depurar.
- Al igual que sucedía en el MBR urbano, el método de extracción con Triton X-100 separó mayor concentración de eEPS del licor de mezcla.
- Aunque los valores de SSLM de ambos MBR fueron parecidos, dadas las diferentes características de los lixiviados tratados y los productos solubles microbianos medidos, sí que se observaron diferencias significativas en las resistencias a la filtración. Las resistencias a la filtración del licor de mezcla del MBR-HS fueron considerablemente mayores que las del licor de mezcla del MBR-LS. Al igual que en el MBR urbano, la resistencia reversible predominó sobre la resistencia irreversible.
- La viscosidad y el tiempo de succión capilar del licor de mezcla del MBR-HS fue significativamente mayor que en el MBR-LS debido a las características del afluente.
- De la observación al microscopio óptico se desprende que el licor de mezcla de los MBR industriales se encuentra disgregado y con un flóculo tipo punta de alfiler.

Las correlaciones entre los principales parámetros de operación de los MBR y las caracterizaciones realizadas a las muestras de licor de mezcla (o fango activo) concluyeron que:

- En el MBR urbano no se observó influencia estadística de la carga másica sobre los parámetros de caracterización del fango activo, lo que fue debido a su escasa variación durante el periodo de muestreo y su muy bajo valor.
- En el MBR urbano, un tiempo de retención hidráulico elevado, implicó bajos valores de tiempo de succión capilar y viscosidad, por lo que se relacionó con mejores filtrabilidades del licor de mezcla y menor ensuciamiento.
- En la regresión por mínimos cuadrados realizada con los datos del MBR urbano, no se obtuvo un modelo consistente para modelizar los SMP y eEPS. En cambio, sí se obtuvieron buenos modelos en el caso de los MBR industriales.
- En el MBR-LS (con bajo contenido en sólidos en el lixiviado) se obtuvo una gran relación estadística entre los SMP y el tiempo de succión capilar y, por tanto, de forma inversa con la filtrabilidad del fango. También se obtuvo una fuerte relación de los SMP con la temperatura.
- La conductividad tiene un elevado efecto sobre la producción de SMP, provocando un estrés bacteriano que se traduce en un incremento de la concentración de los SMP.
- La elevada concentración de sólidos en suspensión en el afluente del MBR-HS implica un menor porcentaje de microorganismos en el licor de mezcla y, por tanto, una menor producción de SMP lo que conlleva que el tiempo de succión capilar se relacione de forma inversa con los SMP.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de extracción de eEPS y purificación de las proteínas para evaluar el ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración a diferentes valores de pH, se concluye que:

Conclusiones

- Comparando el potencial zeta de las eEPS a pH neutro con el de la proteína BSA, se observa que en ambos casos su valor se encuentra en torno a -30 mV. Del mismo modo, al comparar los resultados obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución, se obtiene una coincidencia en ambos picos. Esto indica que las propiedades de las proteínas purificadas a partir de las eEPS son similares a las de la proteína BSA.
- De los ensayos de ultrafiltración a diferentes valores de pH de disoluciones de las proteínas, extraídas de las eEPS y purificadas con sulfato amónico, se obtuvo que a medida que el pH aumenta, el ensuciamiento de la membrana se incrementa. A pH = 9, se consiguió el menor porcentaje de rechazo de proteína, lo que implica que hubo una mayor penetración de proteínas en los poros de la membrana, pudiendo llegar a obstruir éstos. Por el contrario, el mayor rechazo se obtuvo a pH 3.
- En general, la adición de alginato sódico a las disoluciones de proteínas, extraídas de las EPS y purificadas, aumentó el ensuciamiento de la membrana debido al carácter hidrófilo de los carbohidratos. En concreto, se obtuvo que a los valores de pH 6 y 9 hubo mayor ensuciamiento de la membrana.

In this Doctoral Thesis the importance of the characterization of eEPS and SMP to evaluate the process carried out in an MBR is corroborated. These substances are related to the physical characteristics of the mixed liquor.

From the preliminary tests, it is concluded that:

- eEPS extraction methods, which cause minimal cell disruption, are the ones using the cation exchange resin (CER) and the surfactant Triton X-100.
- Standard Addition Method detected interference between the Triton X-100 extraction method and the carbohydrate analysis by Anthrone. No interference was detected between the other methods used.
- The EPS analytical methods selected were: bicinchoninic acid (BCA) method for proteins and Dubois method for carbohydrates, when extraction was performed with Triton X-100 and BCA and Anthrone method for CER extraction. In case of SMP, micro BCA was selected for proteins and Anthrone for carbohydrates.

In the characterization tests of MBR mixed liquor treating municipal wastewater the following conclusions were obtained:

- SMP had an average value of 39.1 mg/L, being protein concentration 50% higher than carbohydrate concentration. DNA concentration was very low, showing low cellular lysis. This fact was corroborated by the high percentage of viable cells.
- Triton X-100 eEPS extraction method extracted more eEPS in comparison with the CER methods, obtaining an average value of 92.2 mg/gVS.
- eEPS were composed mainly by proteins. P/C ratio ranged between 4 and 7.8, being CER 1 the method with the highest ratio.
- DNA values measured in the eEPS indicated that the extraction methods were carried out without causing rupture of the cell membrane.

Conclusions

- Rheological tests carried out in the mixed liquor indicated that it had a non-Newtonian and non-thixotropic behavior. It was observed that the viscosity increased with the concentration of MLSS, being 8.4 g/L the critical concentration from which the viscosity increased exponentially.
- Filtration resistance tests showed a higher percentage of reversible resistance than irreversible. Consequently, membrane fouling was primarily due to cake formation.
- No relationship was found between the MLSS concentrations and the resistance to filtration. Thus, the permeate flux was not related to the concentration of MLSS, within the range of measured values.
- SMP proteins correlated directly to reversible resistance (R_{rev}). The low concentration of carbohydrates in the SMP did not allow to find a correlation with membrane fouling.
- A slight increase in membrane fouling, both reversible and irreversible, was observed with the concentration of eEPS. Correlation obtained was better in the case of the eEPS extracted by CER methods.
- Capillary suction time increased as the concentration of MLSS and viscosity increased. A direct relationship between the CST and the carbohydrate concentration in the SMP was also observed.
- Particle size distribution hardly varied in the analyzed samples, being the mean diameter in volume ($D_{[4,3]}$) 47,5 μm .
- From the observations by the optical microscope, it can be seen that the mixed liquor from the municipal MBR has an open and compact structure, with rotifers and annelids, characteristic of high sludge retention time.
- Nosyk staining method proved to be the most appropriate for the observation of eEPS by epifluorescence microscopy. Results shown a higher concentration of proteins than of carbohydrates. However, the quantification of protein and carbohydrate concentrations is not possible by this technique.

In the characterization experiments of mixed liquor from MBR treating leachates from organic fraction from municipal solid waste (OFMSW) treatment plants, the following conclusions were obtained:

- The characteristics of the wastewater influent from both MBRs were very different due to the previous process carried out in the treatment plants. In particular, the leachate from the plant using a dry anaerobic digestion (MBR-HS) had a higher conductivity and concentration of SS and COD, than the one from the plant using a wet digestion (MBR-LS). The characteristics of these leachates influenced the physicochemical properties of the mixed liquors.
- SMP measured in both MBR were much higher than those measured in the municipal MBR. The highest concentration was found in the MBR-HS, with an average value of 1400 mg/L. This was due to the high conductivity and concentration of non-biodegradable COD, which produced high bacterial stress. As in the municipal MBR, the protein concentration in both MBR was higher than that of carbohydrates (MBR-LS and MBR-HS P/C ratio was 4.59 and 3.58, respectively).
- Unlike SMP, eEPS were similar in the 3 MBR studied, maintaining a high P/C ratio. However, their comparison is more complicated since the MLVSS are formed by both microorganisms and non-biodegradable organic matter.
- As in the municipal MBR, Triton X-100 extracted higher concentration of eEPS.
- Although MLSS of both MBRs were similar, given the different characteristics of the treated leachates and the measured SMP, significant differences in the resistance to filtration were observed. The filtration resistances of the MBR-HS mixed liquor were considerably higher than those of the MBR-LS mixed liquor. As in the municipal MBR, R_{rev} predominated over R_{irrev} .
- Viscosity and CST from MBR-HS was higher than in the MBR-LS due to the influent characteristics.

Conclusions

- From the observation under the optical microscope, it can be seen that the mixed liquor of the industrial MBRs is disaggregated and pin floc type.

Correlations among the main operating parameters of the MBR and the characterization of the mixed liquor samples (or active sludge) concluded that:

- In the municipal MBR there was no statistical influence of the F/M ratio on the parameters of the activated sludge characterization, due to its low variation during the sampling period and its very low value.
- In the municipal MBR, a high HRT implied low values of CST and viscosity. This fact was related to better filtration of the mixed liquor and less fouling.
- The least squares regression performed with the municipal MBR data, did not obtain a consistent model for SMP and eEPS. Otherwise, more fitted models were obtained in case of the industrial MBRs.
- In the MBR-LS a huge statistical relationship was obtained between the SMP and the CST and therefore, inversely with the filterability of the sludge. A strong relationship between SMP and temperature was also obtained.
- Conductivity had a high effect on the SMP production, causing a bacterial stress, resulting in an increase of SMP concentration.
- The high concentration of MLSS in the MBR-HS influent implies a lower percentage of microorganisms in the mixed liquor and, therefore, a lower production of SMP, which means that the CST was inversely related to SMP.

Finally, from the results obtained in the eEPS extraction and purification of proteins to evaluate the fouling of an ultrafiltration membrane at different pH values, we conclude that:

- Comparing the zeta potential of the eEPS at neutral pH with that of the BSA protein, it was observed that in both cases its value was around -30 mV. Likewise, when comparing the results obtained by high-resolution size exclusion chromatography, a coincidence was obtained in both peaks. This indicated that the properties of the proteins purified from the eEPS were similar to those of the BSA protein.
- From the UF tests at different pH values of protein solutions, extracted from the eEPS and purified with ammonium sulfate, it was obtained that as the pH increased, membrane fouling also increased. At pH = 9, the lowest percentage of protein rejection was achieved, which implied that there was a greater penetration of proteins in the membrane pores, which could clog them. In contrast, the highest rejection was obtained at pH 3.
- The addition of sodium alginate to the protein solutions, extracted from the EPS and purified, increased membrane fouling due to the hydrophilic character of the carbohydrates. Specifically, it was obtained that the values of pH 6 and 9 increased membrane fouling.

ANEXOS

CONTRIBUCIONES

Publicaciones en revistas de investigación internacionales:

- **Comparison between mixed liquors of two side-stream membrane bioreactors treating wastewaters from waste management plants with high and low solids anaerobic digestion.** E. Zuriaga-Agustí, J.A. Mendoza-Roca, A. Bes-Piá, J.L. Alonso, C. Álvarez, F. Muñagorri, E. Fernández. WATER RESEARCH 100 (2016) 517-525.
- **Influence of extraction methods on proteins and carbohydrates analysis from MBR activated sludge flocs in view of improving EPS determination.** E. Zuriaga-Agustí, A. Bes-Piá, J.A. Mendoza-Roca, J.L. Alonso-Molina. SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY 112 (2013) 1-10.
- **Relationship between physical and chemical characteristics of a MBR mixed liquor: influence of the EPS on the filtration resistance and other physical parameters.** E. Zuriaga-Agustí, A. Bes-Piá, J.A. Mendoza-Roca. PROCEDIA ENGINEERING 44 (2012) 686-688.

Publicaciones en revistas nacionales:

- **Estudio de los problemas de bioensuciamiento de membranas y espumas de origen biológico en sistemas MBR de tratamiento de lixiviados.** J.L. Alonso, Y. Moreno, E. Zuriaga-Agustí, L. Moreno, I. Amorós, J. Fernández, J.A. Mendoza-Roca, A. Bes-Piá, C. Álvarez, E. Fernández. RETEMA. Revista Técnica de Medio Ambiente (ISSN 1130 – 9881). Septiembre-Octubre (2016) 19-26.

Participaciones en congresos internacionales:

- Characterization of activated sludge in a full scale MBR focusing on sludge rheology. E. Zuriaga-Agustí, J.A. Mendoza-Roca, A. Bes-Piá, J.L. Alonso. **Euromembrane 2015**.
- Correlating exoenzyme activities, operational parameters, cellular viability and EPS in a membrane bioreactor treating domestic wastewater. I. Amorós, C. Grañana, L. Borrás, E. Zuriaga, A. Zornoza, J.L. Alonso. **V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology**.
 - Determination of e-EPS by means of cation exchange resin extraction and epifluorescence microscopy in the sludge from a submerged membrane bioreactor. E. Zuriaga-Agustí, J.A. Mendoza-Roca, A. Bes-Piá, J.L. Alonso. **29th European Membrane Summer School 2013**.
 - Selection of the method of EPS extraction and analysis for the characterization of MBR mixture liquor. E. Zuriaga-Agustí, J.A. Mendoza-Roca, A. Bes-Piá, F.J. Martínez Francisco. **11th International Chemical and Biological Engineering Conference (CHEMPOR)**.

Tabla I: Características EDAR Loriguilla

EDAR Loriguilla	
Caudal agua bruta (m ³ /d)	300 ± 50
V Tratamiento biológico (m ³)	967
V MBR (m ³)	230
SS influente (mg/L)	142 ± 70
DBO ₅ influente (mg/L)	217 ± 22
DQO influente (mg/L)	374 ± 30
N _{TOTAL} influente (mg/L)	54 ± 10
P _{TOTAL} influente (mg/L)	5 ± 1
SS efluente (mg/L)	3.9 ± 0.8
DBO ₅ efluente (mg/L)	6 ± 1
DQO efluente (mg/L)	22 ± 4.8
SSLM (mg/L)	6650 ± 1600
SSVLM (%)	68.6 ± 2
Temperatura licor mezcla (°C)	21.5 ± 3.5

Anexo III

Tabla II: EPS totales, componentes de las eEPS extraídas con el método CER 2 etapas y ratio proteína/carbohidrato

CER 2 etapas	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
EPS (mg/gSSV)	29.94	35.60	32.80	19.84	34.41	15.65	33.60	33.25	40.46	30.35
Proteínas (mgBSA/gSSV)	23.07	28.84	30.45	11.66	22.58	5.69	25.12	26.83	30.86	22.07
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	4.89	5.92	5.00	3.15	3.08	2.99	1.13	1.53	5.59	4.98
ADN (mg/gSSV)	3.33	1.84	1.53	1.65	2.36	2.69	1.30	1.66	1.67	0.88
Ratio P/C	4.72	4.9	6.1	3.7	7.3	1.9	22.3	17.6	5.5	4.4
	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20
EPS (mg/gSSV)	27.2	14.43	14.24	26.23	28.18	15.99	20.00	23.29	19.30	26.68
Proteínas (mgBSA/gSSV)	21.28	7.45	7.50	8.17	6.23	6.44	17.12	9.16	8.49	14.77
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	7.53	3.24	0.98	8.22	1.24	2.79	3.72	8.63	1.28	4.64
ADN (mg/gSSV)	1.03	1.17	2.44	2.19	1.17	1.30	0.87	1.09	1.36	1.22
Ratio P/C	2.8	2.3	7.6	1.0	5.0	2.3	4.6	1.1	6.6	3.2

Tabla II (Cont.): EPS totales, componentes de las eEPS extraídas con el método CER 2 etapas y ratio P/C

CER 2 etapas	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30
EPS (mg/SSV)	26.75	37.44	34.53	38.86	30.07	42.52	31.37	27.59	29.44	21.53
Proteínas (mgBSA/gSSV)	14.81	25.07	24.19	27.95	16.86	33.25	22.08	18.87	19.11	12.79
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	5.94	5.86	5.07	2.8	5.87	3.57	4.22	3.79	4.15	2.59
ADN (mg/gSSV)	2.33	2.76	1.39	2.37	.94	1.97	1.98	1.1	1.55	1.22
Ratio P/C	2.49	4.3	4.8	10.	2.9	9.3	5.2	5.	4.6	4.9
	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40
EPS (mg/SSV)	29.0	18.40	16.36	17.56	16.19	13.82	17.30	18.40	15.34	26.35
Proteínas (mgBSA/gSSV)	21.16	9.44	8.1	9.6	10.79	6.41	7.24	7.92	7.83	17.83
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	3.03	4.05	4.19	3.61	3.74	3.25	4.84	5.46	3.17	4.
ADN (mg/gSSV)	2.09	.38	.59	.51	.85	.53	.56	.54	.61	1.28
Ratio P/C	6.98	2.3	1.9	2.7	2.9	2.0	1.5	1.5	2.5	4.5

Anexo III

Tabla III: EPS totales, componentes de las eEPS extraídas con el método CER 1 etapa y ratio proteína/carbohidrato

CER 1 etapa	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
EPS (mg/gSSV)	-	-	-	-	-	47.18	38.89	42.54	43.22	52.86
Proteínas (mgBSA/gSSV)	-	-	-	-	-	38.10	28.95	34.48	33.51	43.93
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	-	-	-	-	-	4.65	3.80	4.72	4.25	6.39
ADN (mg/gSSV)	-	-	-	-	-	0.14	0.10	0.11	0.13	0.13
Ratio P/C	-	-	-	-	-	8.2	7.6	7.3	7.9	6.9
	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20
EPS (mg/gSSV)	48.5	42.83	32.45	49.00	50.24	65.05	43.20	40.62	36.11	37.94
Proteínas (mgBSA/gSSV)	35.98	35.27	25.62	40.53	40.11	50.73	30.51	31.04	24.33	27.32
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	5.003	4.85	3.40	5.68	4.55	8.68	4.25	4.98	3.43	4.35
ADN (mg/gSSV)	0.19	0.14	0.12	0.13	0.04	0.17	0.20	0.19	0.18	0.22
Ratio P/C	7.2	7.3	7.5	7.1	8.8	5.8	7.2	6.2	7.1	6.3

Tabla III (Cont.): EPS totales, componentes de las eEPS extraídas con el método CER 1 etapa y ratio P/C

CER 1 etapa	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30
EPS (mg/SSV)	53.22	65.21	61.40	54.51	58.04	48.17	46.29	55.81	57.86	61.33
Proteínas (mgBSA/gSSV)	40.4	50.23	47.74	40.36	40.65	37.89	36.65	44.83	46.42	48.54
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	5.49	6.18	5.71	4.76	6.57	3.57	3.79	3.35	4.46	4.72
ADN (mg/gSSV)	3.65	5.06	4.07	3.66	4.42	2.98	2.76	3.8	2.34	3.13
Ratio P/C	7.36	8.1	8.4	8.5	6.2	10.6	9.7	13.4	10.4	10.3
	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40
EPS (mg/SSV)	61.1	35.81	40.01	35.13	40.56	52.02	35.95	42.31	42.68	55.80
Proteínas (mgBSA/gSSV)	51.52	26.32	31.27	25.51	33.8	39.46	26.19	31.11	31.37	42.41
Carbohidratos (mgGlucosa/gSSV)	5.02	3.58	3.46	4.32	4.43	4.93	2.97	4.07	4.47	6.16
ADN (mg/gSSV)	1.87	1.37	1.81	1.46	1.51	4.	2.14	2.66	3.1	3.98
Ratio P/C	10.3	7.4	9.0	5.9	7.6	8.0	8.8	7.6	7.0	6.9

