

Análisis de las correlaciones entre la abundancia de bacterias nitrificantes y los parámetros operacionales y fisicoquímicos relacionados con el proceso biológico de nitrificación en fangos activos

Andrés Miguel Zornoza Zornoza investigador del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia

Liz María Avendaño Villafranca Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia

Luís Borrás Falomir investigador del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Valencia

Daniel Aguado García investigador del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia

José Luis Alonso Molina investigador del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia

Los estudios integrados que relacionan la abundancia de bacterias nitrificantes con las variables fisicoquímicas y operacionales en estaciones depuradoras de aguas residuales a escala real son escasos. El conocimiento de estas relaciones bajo una perspectiva integrada permite aportar valiosa información para la optimización del proceso de nitrificación. El presente estudio fue realizado en una estación depuradora de agua residual (EDAR) con sistema AO y eliminación biológica de nitrógeno mediante aireación intermitente. El objetivo principal fue establecer la asociación entre la abundancia de bacterias nitrificantes y los parámetros operacionales, fisicoquímicos y rendimientos de eliminación del nitrógeno, utilizando para ello un análisis de correlación bivalente. Los resultados obtenidos han permitido establecer una metodología adecuada para la cuantificación de bacterias nitrificantes y definir los parámetros asociados con su abundancia (como la carga másica, la DQO soluble y el tiempo de retención hidráulico) y, por tanto, de interés para la monitorización del proceso.

Palabras clave

EDAR, fangos activos, bacterias nitrificantes, eficiencia en la nitrificación, edad del fango, carga másica, BOA, BON.

Correlation analysis between nitrifying bacteria abundance and operational and physico-chemical parameters associated with nitrification biological process in activated sludge systems

Integrated studies relating nitrifying bacteria abundance to physico-chemical and operational variables in wastewater treatment plants are scarce. The knowledge of these relationships under an integrated perspective can provide valuable information to optimize the nitrification process. The present study was carried out in a wastewater treatment plant (WWTP) with AO and biological nitrogen removal system via intermittent aeration. The aim of this study was to establish the relationships between nitrifying bacteria abundance, and operational and physico-chemical parameters, as well as nitrogen removal performance, using bivariate correlation analysis. The results obtained allowed to establish an appropriate methodology for the quantification of nitrifying bacteria and define parameters associated with its abundance, and therefore of interest for process monitoring, such as the food to microorganism (F/M) ratio, soluble COD and hydraulic retention time.

Keywords

WWTP, activated sludge, nitrifying bacteria, nitrification efficiency, sludge retention time, F/M ratio, AOB, NOB.



1. Introducción

La nitrificación biológica consiste en la oxidación del ión amonio a nitrito y posteriormente a nitrato. Durante este proceso, las bacterias oxidantes de amonio (BOA; *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*), las arqueas oxidantes de amonio (AOA) y las bacterias oxidantes de nitritos (BON; *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* y *Nitrospira*) realizan una respiración aerobia a partir de donadores inorgánicos de electrones (Mota *et al.*, 2005).

El nitrógeno presente en las aguas residuales urbanas generalmente se encuentra en forma de amonio, urea, ácido úrico, proteínas, azúcares aminados y aminas, entre otros. El nitrógeno orgánico es transformado a ión amonio por la actividad microbiana. Los microorganismos proteolíticos degradan las proteínas hasta aminoácidos que, a su vez, son degradados a amonio por los organismos amonificantes (Catalán, 1997), reintroduciendo de esta forma el amoníaco o el amonio en el ciclo del nitrógeno. La urea, el compuesto orgánico con más nitrógeno, es hidrolizada por la enzima ureasa hasta amoníaco y anhídrido carbónico. Por tanto, la generación de amoníaco comienza a producirse antes de llegar las aguas residuales a la estación depuradora (Catalán, 1997). Para completar el ciclo, los iones nitrato y nitrito son convertidos al estado gaseoso N_2 o N_2O mediante la acción de las bacterias desnitrificantes (Catalán, 1997).

Las bacterias nitrificantes se encuentran en una gran variedad de hábitats, incluyendo agua dulce (agua potable y aguas residuales), agua de mar, agua salobre y en el suelo. Las principales especies presentes en los fangos activos son autótrofas, es decir, utilizan el dióxido de carbono o carbono inorgánico como fuente de carbono para la

síntesis de material celular. Por cada molécula de dióxido de carbono asimilado, se oxidan aproximadamente 30 moléculas del ión amonio o 100 moléculas de nitrito. Debido a la gran cantidad de iones amonio y nitrito necesarios para asimilar dióxido de carbono, las bacterias nitrificantes tienen una velocidad de crecimiento muy lenta (Gerardi, 2002).

1.1. Factores que afectan a la nitrificación

El proceso de nitrificación es un paso crítico en la depuración de las aguas residuales, debido a la baja tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes y a la extrema sensibilidad, a las condiciones ambientales y a diversas sustancias inhibitorias que impiden su crecimiento y actividad. Este proceso se encuentra bajo la influencia de distintos factores, que se señalan a continuación (González *et al.*, 2010; Bitton, 1994):

1.1.1. Temperatura

La temperatura en el reactor biológico (T^r) es el factor operacional más influyente en el crecimiento de las bacterias nitrificantes. Existe una importante reducción en la tasa de nitrificación a medida que disminuye la T^r . Por el contrario, la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes aumenta dentro del rango de 8 °C a 30 °C, con un aumento del 10% por cada incremento de 1 °C en el caso del género *Nitrosomonas* (Gerardi, 2002).

En general, la velocidad del proceso disminuye mucho para valores bajos de T^r , siendo muy difícil que se lleve a cabo la nitrificación a temperaturas por debajo de los 10 °C. En estas condiciones es necesario operar con alta edad del fango (EF) para que se pueda llevar a cabo el proceso de forma eficaz (González *et al.*, 2010). Por encima de los

10 °C la nitrificación aumenta casi de forma proporcional a la T^r . Las bacterias del género *Nitrosomonas* aisladas de los fangos activos tienen una tasa de crecimiento óptima a 30 °C, siendo esta la T^r ideal para que tenga lugar el proceso de nitrificación.

La baja temperatura inhibe el crecimiento de *Nitrobacter* de forma más drástica que en *Nitrospira*. Por tanto, es común que los iones nitrito se acumulen en estas condiciones (Gerardi, 2002).

1.1.2. Alcalinidad y pH

La alcalinidad y el pH influyen de forma muy importante sobre la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes. Sin embargo, el pH también se ve afectado por la propia actividad de las bacterias nitrificantes, de forma que al aumentar la nitrificación se produce mayor reducción del pH. En caso de que el agua de entrada no tenga suficiente alcalinidad para compensar el descenso de pH producido por la nitrificación, se produciría la autorregulación de las propias bacterias.

Se ha observado que la tasa máxima de nitrificación se produce a valores de pH entre 7,2 y 9,0 aproximadamente, mientras que con valores inferiores a 6,5 la velocidad de nitrificación se reduce de forma significativa (González *et al.*, 2010).

1.1.3. Oxígeno

La concentración de oxígeno disuelto en el reactor (OD) puede convertirse en un factor limitante para el crecimiento de las bacterias nitrificantes, reduciéndose su abundancia significativamente a concentraciones bajas de OD (González *et al.*, 2010). La concentración óptima de OD para lograr una nitrificación óptima se sitúa por encima de 2 mg/L (Gerardi, 2002).

Los factores responsables de la limitación de OD en el proceso de nitrificación son la falta de difusión de oxígeno a través de los flóculos y la competencia en el consumo de oxígeno por otros organismos aerobios. El aumento de la concentración de OD puede acelerar la nitrificación, permitiendo una mejor penetración de este en los flóculos y por tanto, su disponibilidad para las bacterias nitrificantes (Gerardi, 2002).

El OD debe estar bien distribuido en el tanque de aireación. Para oxidar 1 mg de amonio son necesarios 4,6 mg de O₂ (Bitton, 1994). La cantidad de OD afecta a la actividad de las bacterias nitrificantes en función de la T³r. A niveles bajos de OD se puede producir una nitrificación parcial (Yen *et al.*, 2010), ya que en estas condiciones el crecimiento de las BON se inhibe de forma más acusada que en las BOA.

1.1.4. Amonio y nitrito

Los nutrientes pueden afectar y limitar la síntesis celular y el crecimiento bacteriano. Los principales nutrientes inorgánicos necesarios para los microorganismos son: N, S, P, K, Mg, Ca, Fe, Na y Cl (Madigan *et al.*, 2009). El crecimiento de las BOA y BON sigue la cinética de Monod y depende de las concentraciones de amonio y de nitrito respectivamente (Bitton, 1994).

1.1.5. Relación entre la DBO₅ y el NKT

El agua residual afluente al proceso de fangos activos contiene una elevada concentración de materia orgánica y otros nutrientes que son utilizados por las bacterias como fuente de carbono y energía para su metabolismo, crecimiento y reproducción. La abundancia de organismos nitrificantes disminuye al aumentar la relación entre la demanda bioquímica de oxígeno y el nitrógeno Kjeldahl

Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a numerosas sustancias tóxicas que pueden inhibir su crecimiento, lo que provoca una disminución en la tasa de nitrificación o una interrupción del proceso por la muerte de las bacterias implicadas

dahl total (DBO₅/NKT). En procesos combinados de eliminación de carbono y de nitrógeno esta relación es superior a 5, mientras que cuando se separan ambos procesos en la etapa de nitrificación la relación es superior a 3 (Bitton, 2011).

1.1.6. Sustancias tóxicas

Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a numerosas sustancias tóxicas que pueden inhibir su crecimiento, lo que provoca una disminución en la tasa de nitrificación o una interrupción del proceso por la muerte de las bacterias implicadas (Bitton, 1989).

Los compuestos orgánicos más tóxicos para las bacterias nitrificantes son el cianuro, la tiourea, los fenoles, las anilinas y los metales pesados (plata, mercurio, níquel, cromo, cobre y zinc) (Bitton, 1994).

Wells *et al.* (2009) observaron que, a pesar de los efectos inhibitorios sobre la actividad de las BOA en cultivo puro y mixto originado por el cromo, níquel, mercurio, cadmio, zinc y cobre, solo la presencia de cromo y níquel en el afluente tiene una correlación significativa con la variabilidad de las BOA.

En algunos estudios se propone la independencia entre la abundancia de BOA, BON y algunos parámetros operacionales y fisicoquímicos en el proceso de nitrificación. Sin embargo, la eficiencia del proceso en las EDAR es el resultado de la interacción de todas las variables. A pesar de la similitud del diseño y operación

de algunas EDAR, se pueden dar situaciones muy diferentes y por tanto, distintos rendimientos. La modificación de los parámetros operacionales, contemplados desde un punto de vista independiente y basada en la experiencia de otras instalaciones, supone en ocasiones asumir un elevado compromiso y riesgo principalmente cuando dicha modificación suponga un incremento en el coste de explotación, por ejemplo el gasto energético. De ahí el interés en la divulgación de metodologías prácticas y sencillas que permitan estudiar y evaluar la influencia conjunta de todas las variables sobre el proceso de nitrificación en plantas depuradoras a escala real.

El presente estudio tiene como objetivo establecer, de forma preliminar y exploratoria, las relaciones entre la abundancia de BOA, BON y los distintos parámetros operacionales, fisicoquímicos del afluente y rendimientos de eliminación del nitrógeno en el efluente de la EDAR QB, utilizando el análisis de correlación bivalente. La relación entre los rendimientos de eliminación del nitrógeno y parámetros operacionales y fisicoquímicos referidos a este trabajo ha sido descrita por Zornoza *et al.* (2011). La abundancia de la población de BOA y BON en la EDAR QB ha sido descrita por Avendaño (2011).

Los resultados obtenidos han permitido definir los parámetros operacionales y fisicoquímicos asociados con la abundancia de la población de bacterias nitrificantes y, por tan-



to, de mayor relevancia para el control del proceso de nitrificación en la EDAR estudiada. Este artículo es un resumen de la documentación presentada en las 'VIII Jornadas Técnicas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo', celebradas en Sevilla el 19 y 20 de abril de 2012 y organizadas por el Grupo Bioindicación de Sevilla (GBS).

2. Material y métodos

2.1. Toma de muestras

Las muestras se tomaron en la EDAR QB, que trata un caudal promedio anual de 39.748 m³/día (datos EPSAR 2010) y una población de 141.689 habitantes equivalentes. Cuenta con un proceso biológico llevado a cabo en cuatro reactores AO (anóxico-óxico) en paralelo y de geometría rectangular (75 x 20 x 4,5 m).

Se han realizado campañas de muestreo con una frecuencia quincenal durante 1 año, desde diciembre de 2008 hasta diciembre de 2009 (24 campañas). Cada una de ellas se ha desarrollado durante 4 días consecutivos repartidos de la siguiente forma: en los tres primeros días (1, 2 y 3) se muestreó el afluen-

te al reactor. En el tercer día (3) se muestreó también el efluente del decantador secundario. Estas muestras fueron compuestas, es decir, se obtuvieron a partir de la mezcla de muestras simples horarias en relación al caudal (APHA, 2005). En el cuarto día (4) se tomó una muestra simple de licor mezcla en la salida del reactor biológico.

2.2. Parámetros fisicoquímicos

Los días 1 y 2 se analizaron en el afluente al reactor la DQO total, DQO soluble (DQOs) y DBO₅, mientras que el día 3 se llevó a cabo un análisis completo del afluente y efluente. El objetivo del primer análisis fue estudiar la influencia de la carga orgánica y del segundo establecer el rendimiento del proceso biológico. El día 4 se procedió al análisis completo del licor mezcla.

Los parámetros se determinaron siguiendo los procedimientos normalizados (APHA, 2005). La fracción filtrada (f) se obtuvo utilizando un filtro de lana de vidrio (Whatman GF/C), con un tamaño nominal de poro de 1,2 µm, y la fracción soluble (s) se obtuvo a través de un filtro de 0,45 µm (Grady, 1989).

Se calculó el porcentaje de la DQOs (%DQOs) con el fin de determinar la fracción soluble del total del valor de la DQO. El cálculo de este parámetro es de gran utilidad en la explotación, ya que permite detectar fácilmente cambios en la calidad del afluente al reactor, por ejemplo debido a vertidos internos o externos, que puedan comprometer la estabilidad del proceso biológico.

2.3. Parámetros operacionales

Los parámetros operacionales fueron calculados según Metcalf y Eddy (1991) y se muestran en la **Tabla 1**.

Debido a la inercia en el proceso biológico de algunos parámetros operacionales, como por ejemplo la carga orgánica afluente al reactor biológico (Salvadó *et al.*, 1993), se han calculado para su estudio distintas expresiones promedio de la carga másica (CM) y tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr).

Uno de los parámetros operacionales que probablemente más dificultad muestra en su representación es el OD, el cual en este caso corresponde a medidores en continuo situados en la parte final del reactor biológico. Es frecuente observar en las EDAR, como la estudiada, fluctuaciones importantes diarias de OD debido, por ejemplo, a vertidos externos e internos, a sobrecargas orgánicas en el afluente o, incluso, al régimen de aireación intermitente en continuo (ciclos parada/marcha). En estos casos las desviaciones del valor promedio diario de OD son significativas, no siendo valores representativos de la disponibilidad del mismo para los microorganismos.

El tiempo diario en el cual los microorganismos se encuentran sometidos a un determinado nivel de OD es importante desde el punto de vista del proceso biológico. Por ello, los valores de OD en el reactor fue-

Tabla 1. Parámetros operacionales.

Parámetro	Símbolo	Unidades	Observaciones
Tiempo de retención hidráulico en reactor	TRHr1 TRHr2a TRHr2b TRHr3	horas	TRHr1: día 3 TRHr2a: promedio días 2 y 3 TRHr2b: promedio días 1 y 2 TRHr3: promedio días 1, 2 y 3
Carga másica	CM1 CM2a, CM2b CM3	kg DBO ₅ /kgSSVLM.d kg DQO ₅ /kgSSVLM.d	CM1: día 3 CM2a: promedio días 2 y 3 CM2b: promedio días 1 y 2 CM3: promedio días 1, 2 y 3
Edad del fango	EM	días	
Temperatura reactor	T _r	°C	
Oxígeno disuelto	ODb ODm ODa	%	ODb: < 0,8 mg/L ODm: 0,8 - 2 mg/L ODa: > 2 mg/L

ron distribuidos en tres rangos (ODb, ODm y ODa) y expresados en porcentaje de tiempo (%). No obstante, esta forma de expresión no contempla los periodos prolongados de tiempo de OD, ya que, por ejemplo, no es lo mismo desde el punto de vista del proceso una concentración en el reactor de 0,2 ppm durante 8 horas repartidas a lo largo de 1 día que 8 horas seguidas. Por tanto, debido a esto último y a la escasa representatividad en algunos casos que supone agrupar por rangos los valores de OD, los resultados de correlación de este estudio no deben tomarse de una forma concluyente, sino orientativa.

2.4. Identificación y cuantificación de bacterias nitrificantes

Se utilizó la técnica de hibridación *in*

situ con sondas marcadas con fluoróforos (FISH) para la identificación de la comunidad general de bacterias así como de BOA y BON, utilizando para ello las sondas moleculares descritas en la **Tabla 2**.

Después de realizada la identificación, se procedió a la toma de imágenes para la cuantificación de bacterias. Esta consistió en la captura de 20-25 campos por cada sonda y muestra analizada. El análisis de imagen se realizó mediante el programa MATLAB 7.1, descomponiendo la imagen en escala de grises con valores de 0 (negro) a 225 (blanco) y facilitando de esta forma el conteo de píxeles (Borras, 2008). Las imágenes tomadas fueron introducidas en el software de cuantificación desarrollado por Borras (2008), obteniendo el porcentaje e incertidumbre del área ocupada por

las bacterias nitrificantes en función del total de la comunidad bacteriana presente (sonda EUBmix). Además, dicho porcentaje de área fue expresado en mg SSVLM/L.

2.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis bivariante con el fin de estudiar de forma preliminar y exploratoria la relación lineal entre la abundancia de bacterias nitrificantes y el resto de variables, calculándose para ello los coeficientes de Pearson (CP) y Spearman (CS). Previamente, se realizó una transformación logarítmica de aquellas variables que no mostraron una distribución normal ($variable = \ln [variable + 1]$) (Esteban *et al.*, 1991), considerándose significativas las relaciones entre variables cuando el valor p fue menor de 0,05 y 0,01. En las tablas de resultados se han omitido aquellos coeficientes

Tabla 2. Sondas moleculares utilizadas.

Sonda	Secuencia (5' - 3')	Especificidad	% FA ¹	Referencia
EUB 338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	0 - 50	Amann (1990)
EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetes</i>	0 - 50	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	0 - 50	Daims <i>et al.</i> (1999)
Nso 1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA ²	β <i>Proteobacteria</i> ³	45	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Nse 1472	ACCCAGTCATGACCCCC	<i>N. europaea</i>	50	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
Nmo 218	CGGCCGCTCCAAAAGCAT	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	35	Gieseke <i>et al.</i> (2001)
NEU	CCCCTCTGCTGCACTCTA	<i>Nitrosomonas alophila</i> , <i>eutropha</i> y <i>europaea</i> <i>Nitrosomonas sp.</i> <i>Nm104</i> .	40	Wagner <i>et al.</i> (1995) Wagner <i>et al.</i> (1995)
CNEU	TTCCATCCCCCTCTGCCG	Competidora ⁴	40	Wagner <i>et al.</i> (1995)
Ntspa 662	GGAATCCGCGCTCCTCT	<i>Nitrospira spp.</i>	35	Daims <i>et al.</i> (1999)
CNtspa 662	GGAATCCGCTCCTCCTCT	Competidora ⁴		Daims <i>et al.</i> (1999)
NIT 3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter spp.</i>	40	Wagner <i>et al.</i> (1996)
CNIT 3	CCTGTGCTCCAGGCTCCG	Competidora ⁴		Wagner <i>et al.</i> (1996)

Nota: ¹FA: porcentaje de formamida; ² moodificada con 4 bases LNA (Alonso *et al.*, 2009); ³ AOB; ⁴ sin marcar para aumentar la especificidad de la sonda correspondiente Ntspa 662 o NIT3.



que no mostraron al menos alguno de los dos niveles de significación. El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS versión 19.

3. Resultados

Las señales positivas de hibridación de la población de BOA correspondieron a las sondas Nso 1225 y Nmo 218 (**Figuras 1 y 2**), mientras que las correspondientes a las sondas NEU y Nse 1472 fueron escasas y negativas respectivamente.

Las señales positivas de hibridación de la población de BON correspondieron a la sonda Ntspa 662 (**Figura 3**), mientras que las correspondientes a las sondas NIT 3 y Nsr 1156 fueron negativas.

Los resultados de abundancia de la población de BOA y BON se resumen en la **Tabla 3**.

Los rendimientos del proceso de nitrificación ($rN-NH_4$ y $rNKTs$) y los rangos de operación de las distintas variables durante el periodo de estudio se resumen en **Tablas 4, 5 y 6**.

La población de BOA presentó, en general, una correlación negativa moderada y alta frente a las formas más reducidas del nitrógeno del efluente ($NKTs$ y $N-NH_4^+$) y correlación positiva respecto a sus rendimientos de eliminación (**Tabla 7**). Los valores más elevados fueron observados con la sonda Nso1225, que corresponde a *Nitrosomonas* sp. Por el contrario, la población de BON (sonda Ntspa, que corresponde a *Nitrospira* sp.) presentó escasa correlación significativa con $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$. La EF solo mostró correlación significativa con *Nitrosomonas oligotropha* (CS; 0,41).

La CM presentó, de forma general, una moderada correlación negativa frente a la población de BOA y BON (**Tabla 8**). Las CM expresada como CM2b mostró valores de co-

Figura 1. A = AOB Nso 1225; y B = mismo campo. EUB338mix, 600x.

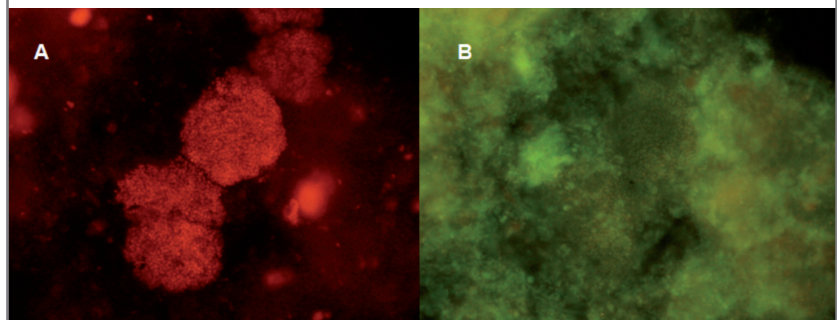


Figura 2. A = AOB. *N. oligotropha*, Nmo 218; y B = mismo campo. EUB338mix, 600x.

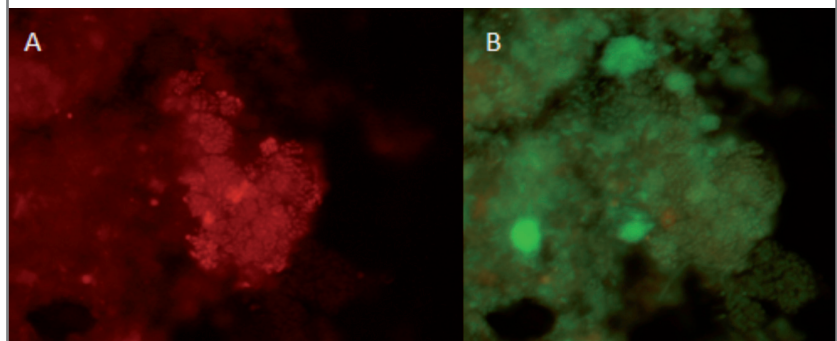


Figura 3. A = NOB. *Nitrospira* sp., Ntspa 662; y B = mismo campo. EUB338mix, 600x.

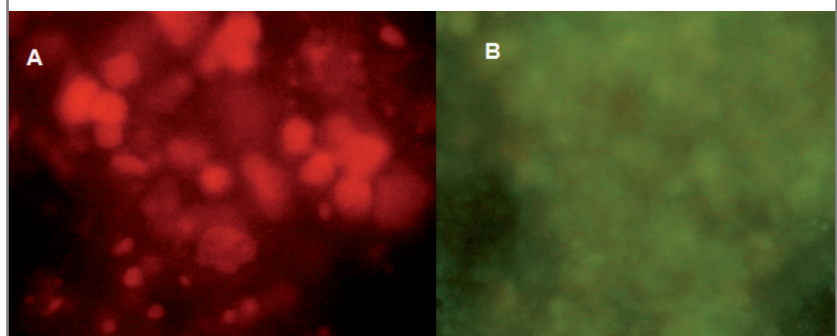


Tabla 3. Valor medio, mínimo, máximo y desviación estándar de la abundancia de bacterias nitrificantes.

Sonda	Ud.	Media	Incertidumbre (D. estándar/ $\sqrt{n^\circ}$ campos)
Nso 1225	%	4,0	0,4
	mg SSVLM/L	78,4	9,0
Nmo 218	%	2,8	0,3
	mg SSVLM/L	54,2	6,2
Ntspa 662	%	1,6	0,3
	mg SSVLM/L	31,1	4,7

Tabla 4. Valor medio, mínimo, máximo y desviación estándar de los rendimientos y estados del nitrógeno en el afluente (Afl) y en el efluente (Efl) al reactor.

Parámetro	Afl o Efl	Media	Mínimo - máximo	D. estándar
NKTs (mg/L)	Afl	45	24 - 72	16
NKTs (mg/L)	Efl	11,1	1,0 - 36,0	10,4
rNKTs (%)		78	45 - 96	17
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	Afl	40	22 - 62	12
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	Efl	9,2	0,1 - 32,6	9,7
rN-NH ₄ ⁺ (%)		80	42 - 100	19
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	Efl	1,36	0,04 - 5,67	1,47
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	Efl	6,2	0,4 - 11,1	2,6

Tabla 5. Valor medio, mínimo, máximo y desviación estándar de los parámetros operacionales.

Variable	Media	Mínimo - máximo	D. estándar
CM1 (kg DBO ₅ /kg SSVLM.d)	0,25	0,09 - 0,85	0,16
CM2a (kg DBO ₅ /kg SSVLM.d)	0,23	0,10 - 0,64	0,12
CM2b (kg DBO ₅ /kg SSVLM.d)	0,18	0,08 - 0,33	0,07
CM3 (kg DBO ₅ /kg SSVLM.d)	0,20	0,08 - 0,47	0,09
CM1 (kg DQOs/kg SSVLM.d)	0,23	0,10 - 0,92	0,17
CM2a (kg DQOs/kg SSVLM.d)	0,21	0,09 - 0,69	0,12
CM2b (kg DQOs/kg SSVLM.d)	0,16	0,06 - 0,29	0,06
CM3 (kg DQOs/kg SSVLM.d)	0,18	0,10 - 0,49	0,09
EF (días)	11	5 - 28	6
T ^a	21	14 - 29	4
TRHr1 (h)	14,3	8,7 - 25,0	3,3
TRHr2a (h)	15,4	10,7 - 23,6	2,6
TRHr2b (h)	18,4	14,8 - 24,4	2,3
TRHr3 (h)	17,0	13,5 - 22	2,0
ODb (%)	33	5 - 69	18
ODm (%)	62	12 - 95	19
ODa (%)	5	0 - 40	10

relación más bajas que el resto de expresiones (CM1, CM2a y CM3). Los coeficientes obtenidos de la CM calculada con el parámetro DQOs fueron aproximadamente del mismo orden que los calculados con la DBO₅.

El TRHr presentó correlación positiva frente a *Nitrosomonas oligotropha* y *Nitrospira* sp., siendo el TRHr2a la expresión que mostró mayores niveles de significación. No se observó correlación significativa con el OD y la T^a.

La concentración de tensioactivos aniónicos (TA) presentó correlación negativa con *Nitrosomonas* sp., mientras que el %DQO presentó en general correlación negativa con la población de BON y BOA (Tabla 9). El %DQOs1 presentó el mayor número de coeficientes de correlación significativos, especialmente elevados en el caso de *Nitrosomonas* sp.

La concentración de níquel, zinc, fenoles y sulfatos no presentó correlación significativa con la población de BOA y BON, mientras que *Nitrosomonas* sp. mostró moderada correlación negativa con la concentración de cloruros (Tabla 10). Las relaciones DBO₅/NKT y DQOs/NKTs se correlacionaron negativamente con la población de BOA y BON, siendo los coeficientes ligeramente superiores en el caso de DQOs/NKTs. La relación DBO₅/NKT no presentó coeficientes significativos.

4. Discusión

4.1. Rendimientos del proceso de nitrificación

La correlación significativa observada entre la presencia de BOA y el rendimiento de eliminación de N-NH₄⁺ y NKTs indica la buena señal de hibridación detectada de las sondas Nso 1225 y Nmo 218, así como la adecuada metodología empleada



en el tratamiento y cuantificación de las imágenes tomadas (Borras, 2008). Las diferencias significativas encontradas de los coeficientes de correlación entre *Nitrosomonas oligotropha* y *Nitrosomonas sp.*, con valores más elevados en el caso de este último, podrían indicar la presencia de otras especies de BOA en las muestras analizadas. La ausencia en general de correlaciones significativas entre la presencia de BON y $N-NO_3^-$ en el efluente pudo ser debida a la eficiencia en el proceso de desnitrificación.

4.2. Edad del fango y temperatura en el reactor biológico

La EF y la T^{ar} están íntimamente relacionadas en el proceso de nitrificación debido a la baja tasa de crecimiento de las BOA y BON (Gerardi, 2002). La T^{ar} , al ser una variable que viene impuesta por la estacionalidad, determina la EF a mantener en el reactor biológico. Según los resultados obtenidos, solo la abundancia de BOA se asoció de forma significativa con la EF, indicando que la población de BON podría tener una menor dependencia con dicha variable. Los coeficientes de correlación menores y menos significativos de la EF en relación con los valores inversos y más significativos observados de la CM podrían deducirse debido a que ambos parámetros no siempre evolucionan de forma inversa y proporcional (Zornoza *et al.*, 2010). La T^{ar} , en el rango 14-29 °C, no presentó una influencia significativa sobre la abundancia de BOA y BON, probablemente debido a los valores de operación adecuados de EF.

4.3. Carga másica y porcentaje de DQO soluble

Los elevados coeficientes de correlación observados indicaron que

Tabla 6. Valor medio, mínimo, máximo y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos en el afluente.

Parámetro	Media	Mínimo - máximo	D. estándar
T. aniónicos (mg/L)	3,3	1,2 - 7,5	1,8
DQOs1 (%)	52	42 - 75	8
DQOs2a (%)	51	43 - 70	6
DQOs2b (%)	47	28 - 63	6
DQOs3 (%)	49	37 - 61	5
Níquel (mg/L)	0,13	< 0,02 - 0,45	0,18
Zinc (mg/L)	2,10	0,18 - 4,02	1,32
Fenoles (mg/L)	0,94	0,37 - 2,05	0,49
Sulfatos (mg/L)	221	159 - 293	35
Cloruros (mg/L)	341	133 - 520	94
DBO ₅ /NKT	4,5	2,7 - 7,9	1,1
DBO ₅ f/NKTs	3,3	19 - 8,0	1,4
DQOs/NKTs	4,9	2,9 - 10,1	1,5

Tabla 7. Coeficientes de correlación entre los rendimientos y estados del nitrógeno del efluente y la población de BOA y BON.

Sonda	Coficiente	NKTs	rNKTs	N-NH ₄ ⁺	rN-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻
Nso1225	CP	- 0,72**	0,87**	- 0,73**	0,85**		
(%)	CS	- 0,72**	0,77**	- 0,74**	0,79**		
Nso1225	CP	- 0,71**	0,85**	- 0,73**	0,83**		
(mg SSVLM/L)	CS	- 0,73**	0,73**	- 0,75**	0,78**		
Nmo218	CP	- 0,46*	0,63**	- 0,58**	0,63**		
(%)	CS	- 0,49*	0,59**	- 0,60**	0,69**		
Nmo218	CP	- 0,43*	0,62**	- 0,54**	0,62**		
(mg SSVLM/L)	CS	- 0,57*	0,61**	- 0,68**	0,74**		
Ntspa662	CP						
(%)	CS		0,41*				0,43*
Ntspa662	CP						
(mg SSVLM/L)	CS						

Nota: Nivel de significación: ** p < 0,01; * p < 0,05; CS = coeficiente de Pearson; y CS = coeficiente de Spearman.

Tabla 8. Coeficientes de correlación entre la carga másica y la población de BOA y BON.

Sonda	Coefficiente	CM1 (DBO ₅)	CM2a (DBO ₅)	CM2b (DBO ₅)	CM3 (DBO ₅)	CM1 (DQOs)	CM2a (DQOs)	CM2b (DQOs)	CM3 (DQOs)
Nso1225	CP	- 0,55**	- 0,54**	- 0,43*	- 0,54**	- 0,58**	- 0,57**	- 0,43*	- 0,55**
(%)	CS	- 0,54**	- 0,53**	- 0,45*	- 0,52**	- 0,61**	- 0,52**		- 0,50*
Nso1225	CP	- 0,61**	- 0,60**	- 0,49*	- 0,60**	- 0,63**	- 0,63**	- 0,49*	- 0,62**
(mg SSVLM/L)	CS					- 0,65**	- 0,54**	- 0,46*	- 0,55**
Nmo218	CP		- 0,43*			- 0,41*	- 0,47*		- 0,42*
(%)	CS						- 0,43*		
Nmo218	CP	- 0,48*	- 0,52**		- 0,47*	- 0,49*	- 0,55**	- 0,48*	- 0,51*
(mg SSVLM/L)	CS	- 0,51*	- 0,53**		- 0,46*	- 0,52**	- 0,52*	- 0,42*	- 0,49*
Ntspa662	CP	- 0,46*	- 0,48*		- 0,43*	- 0,48*	- 0,50*		- 0,48*
(%)	CS	- 0,45*	- 0,44*			- 0,46*	- 0,44*		
Ntspa662	CP	- 0,55**	- 0,60**	- 0,46*	- 0,54**	- 0,56**	- 0,58**	- 0,51*	- 0,57**
(mg SSVLM/L)	CS	- 0,41*				- 0,41*			

Nota: Nivel de significación: ** p < 0,01; * p < 0,05; CS = coeficiente de Pearson; y CS = coeficiente de Spearman.

los periodos de altas CM causaron una disminución de la población de BOA y BON. Durante estos periodos se incrementa la concentración de materia orgánica en la zona óxica del reactor, dándose condiciones que favorecen el crecimiento y la respiración de la población heterótrofa y, por consiguiente, un mayor consumo de oxígeno y condiciones desfavorables para la población bacteriana autótrofa.

No se observaron diferencias significativas entre las distintas expresiones de la CM, debido probablemente a que las variaciones diarias de la EDAR QB no fueron importantes. De todas ellas, la CM2b fue la que presentó los valores menos significativos. Los coeficientes de correlación obtenidos de la CM calculada con el parámetro DBO₅ fueron del mismo orden que los calculados con la DQOs, lo que demuestra el interés de este último como parámetro de rutina al ser más rápido su cálculo (de horas,

frente a los cinco días necesarios para la determinación de la DBO₅).

Según los resultados obtenidos, se observó una influencia negativa sobre la abundancia de bacterias nitrificantes al aumentar el porcentaje de DQO soluble, especialmente en *Nitrosomonas* sp. El aumento de la fracción soluble, aunque no diferencie entre fracción biodegradable y lentamente biodegradable, implica una mayor disponibilidad de materia orgánica y, por tanto, condiciones favorables de crecimiento y respiración de la población heterótrofa frente a la autótrofa. La expresión del porcentaje de DQO soluble, día anterior (%DQOs1) al análisis del licor mezcla (día 4), se presenta como la expresión más adecuada en el control de la abundancia de BOA y BON en la EDAR QB.

4.4. Oxígeno disuelto

El promedio de OD en QB se situó por debajo de 2 mg/L el 95% del

tiempo (Tabla 5), valores considerados como ineficientes en el proceso de nitrificación (Bitton, 1994). No se observaron coeficientes de correlación significativos con los niveles de OD mantenidos en el reactor biológico. Estos resultados indicarían que el OD podría no ser un factor muy limitante, principalmente durante periodos con ausencia de sobrecargas orgánicas.

Dicha afirmación podría estar de acuerdo con los resultados encontrados por Schramm *et al.* (1999), que indican que el género *Nitrospira* es más competitivo con niveles bajos de OD que el género *Nitrobacter*, siendo el primero dominante en el presente estudio (Avenidaño, 2011). Sería interesante continuar estudiando en profundidad la sensibilidad de los distintos géneros y especies de bacterias nitrificantes frente a distintos niveles de OD en instalaciones a escala real. La determinación de aquellas condiciones ambientales



en la EDAR que favorecen el crecimiento de bacterias nitrificantes manteniendo niveles bajos de OD en el reactor es de gran interés por el ahorro energético que supone en los sistemas de aireación.

4.5. Tiempo de retención hidráulico en el reactor

El TRHr y la CM son variables operacionales que conceptualmente están relacionadas, y por ello se deben tener en cuenta de forma conjunta en la explotación de las EDAR. En aquellas instalaciones cuyo diseño se encuentra sobredimensionado y disponen de varios reactores en paralelo, la modificación del TRHr con el llenado o vaciado de reactores sin variar la cantidad total de SSLM en el sistema, puede ser una herramienta muy útil en el control operacional.

La EDAR QB dispone de 4 reactores en paralelo, los cuales no se mantienen siempre operativos. Ade-

más, presenta una disminución del caudal de entrada principalmente en los meses de verano, lo cual influye en el TRHr. El incremento de este se relacionó positivamente con la abundancia de BOA y BON, minimizando el efecto de la baja tasa de crecimiento característica de la población de bacterias nitrificantes.

4.6. DBO₅/NKT, DBO₅f/NKTs, DQOs/NKTs

Los resultados obtenidos sobre la disminución de la actividad nitrificante al aumentar la relación de DBO₅/NKT coinciden con los de Bitton (2011), observándose una disminución de la población de BOA y BON al aumentar dicha relación. Un aumento de esta variable favorece el crecimiento y respiración de las bacterias heterótrofas frente a las autótrofas en la zona oxica del reactor. La relación DQOs/NKTs presentó mayor grado de significación que la DBO₅/NKT,

convirtiéndose en un parámetro alternativo interesante para el control del proceso debido a la rapidez de la determinación de la DQO frente a la DBO₅.

4.7. Sustancias tóxicas

Los resultados respecto a las sustancias tóxicas estudiadas indican que la concentración de estas no causaron un efecto negativo sobre la abundancia de BOA y BON, a pesar del efecto negativo que la concentración de níquel originó en el rendimiento de la nitrificación (Zornoza *et al.*, 2011). Los vertidos de agentes tensioactivos aniónicos presentaron un efecto negativo sobre la abundancia de BOA.

5. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en la EDAR QB deben considerarse como recomendaciones u orientaciones para el control en el resto de instalaciones. Estas corresponden a un análisis preliminar exploratorio de los datos obtenidos durante 1 año y serán completadas utilizando análisis avanzado multivariante (análisis directo del gradiente) en el estudio de las poblaciones de BOA y BON en otras EDAR.

El análisis de las correlaciones entre la abundancia de BOA, BON y los distintos parámetros operacionales, físicoquímicos del afluente y rendimientos de eliminación del nitrógeno relacionados con el proceso biológico de nitrificación mostró que:

- Altas cargas másicas se asociaron negativamente con la abundancia de BOA y BON. El parámetro DQO soluble sería un parámetro de gran interés para el cálculo de la carga másica. El porcentaje elevado de DQO soluble afluente al reactor se asoció negativamente con la abundancia de bacterias nitrificantes, es-

Tabla 9. Coeficientes de correlación entre los tensioactivos aniónicos, DQO soluble afluente al reactor y la población de BOA y BON.

Sonda	Coeficiente	TA	%DQOs1	%DQOs2a	%DQOs2b	%DQOs3
Nso1225	CP		- 0,73**	- 0,46*		
(%)	CS		- 0,68**			
Nso1225	CP	- 0,44*	- 0,75**	- 0,48*		
(mg SSVLM/L)	CS		- 0,65**			
Nmo218	CP		- 0,50*	- 0,57**		- 0,46*
(%)	CS		- 0,47*	- 0,49*		- 0,42*
Nmo218	CP		- 0,55**	- 0,59**		- 0,50*
(mg SSVLM/L)	CS		- 0,52*	- 0,44*		- 0,41*
Ntspa662	CP		- 0,47*	- 0,51*		- 0,48*
(%)	CS		- 0,46*	- 0,50*		- 0,46*
Ntspa662	CP		- 0,46*	- 0,46*		- 0,44*
(mg SSVLM/L)	CS		-0,52*	- 0,42*		- 0,41*

Nota: Nivel de significación: ** p < 0,01; * p < 0,05; CS = coeficiente de Pearson; y CS = coeficiente de Spearman.

Tabla 10. Coeficientes de correlación entre parámetros fisicoquímicos del afluente al reactor y la población de BOA y BON.

Sonda	Coefficiente	Cloruros	DBO ₅ /NKT	DBO ₅ /NKTs	DQOs/NKTs
Nso1225	CP		- 0,55**		- 0,62**
(%)	CS	- 0,57*	- 0,53*		- 0,54**
Nso1225	CP		- 0,53*		- 0,61**
(mg SSVLM/L)	CS	- 0,54*	- 0,47*		- 0,47*
Nmo218	CP		- 0,48*		- 0,48*
(%)	CS		- 0,48		- 0,43*
Nmo218	CP		- 0,50*		- 0,50*
(mg SSVLM/L)	CS		- 0,51*		
Ntspa662	CP		- 0,43*		- 0,55**
(%)	CS				
Ntspa662	CP		- 0,44*		- 0,54**
(mg SSVLM/L)	CS				

Nota: Nivel de significación: ** p < 0,01; * p < 0,05; CS = coeficiente de Pearson; y CS = coeficiente de Spearman.

pecialmente en *Nitrosomonas* sp. La determinación de dicho porcentaje en el día anterior al análisis del licor mezcla se presenta como una variable de interés a controlar. La relación DQOs/NKTs se asoció negativamente con la abundancia de BOA y BON. Esta se presenta como una alternativa plausible frente a la relación DBO₅/NKT.

- La temperatura en el reactor biológico no se asoció de forma significativa con la abundancia de BOA y BON, probablemente debido a valores adecuados de operación de la edad del fango. Solo la abundancia de BOA se relacionó de forma significativa con el aumento de la edad del fango.

- El aumento del tiempo de retención hidráulico en el reactor se asoció positivamente con la abundancia de BOA y BON y, por tanto, se presenta como una variable operacional de interés para el control del proceso de nitrificación.

6. Agradecimientos

Este estudio forma parte del proyecto de investigación 'Estudio integrado del proceso de fangos activos' financiado por la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana (EP-SAR). Agradecer la colaboración de la empresa AVSA-EGEVASA y del Subprograma MICINN PTA-2011.

Bibliografía

[1] Alonso, J.L.; Cuesta, G.; Ramírez, G.W.; Morenilla, J.J.; Bernácer, I.; Lloret, R.M. (2009). Manual de técnicas avanzadas para la identificación y control de bacterias filamentosas. Ed. Epsar-Generalitat Valenciana, págs.21-36, Valencia, España.

[2] APHA-AWWA-WEF (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21 ed. American public Health Association/American Water Works Association/ Water Environment Federation, Washington, DC, Estados Unidos.

[3] Avendaño, L. (2011). Estudio de la población de bacterias nitrificantes y su relación con los parámetros fisicoquímicos, biológicos y operacionales en una EDAR con sistema convencional de fangos activos. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

[4] Bitton, G.; Dutkák, B.; Hendricks, C. (1989). Ecological assessment of hazardous waste sites

[5] Bitton, G. (1994). Wastewater microbiology. Wiley-Liss, 3ª ed, Universidad de Florida, Estados Unidos.

[6] Bitton, G. (2011). Wastewater microbiology. Wiley-Liss, 5ª edición, Universidad de Florida, Estados Unidos.

[7] Borrás, L. (2008). Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

[8] Catalán, J. (1997). Depuradoras. Bases científicas. Bellico, Librería Editorial, Madrid, España.

[9] Esteban, G.; Tellez, C.; Bautista, L.M. (1991). Dynamics of ciliated protozoa communities in activated sludge process. Water Res, núm. 25, págs. 967-972.

[10] Gerardi, M. (2002). Nitrification and denitrification in the activated sludge process. Wiley-Interscience, Nueva York, Estados Unidos.

[11] González, P.; Quintans, P.; Vizcaino, M.; Miguel, R.; González, J.; Pérez, J.; García, R. (2010). Estudio de la inhibición del proceso de nitrificación como consecuencia de la acumulación de metales en el fango biológico de la EDAR de León y su alfoz. Tecnología del Agua, núm. 322, págs. 28-38.

[12] Grady, C.P. (1989). Dynamic modeling of suspended growth biological wastewater treatment processes. En: Patry, G. y Chapman, D. (eds). Dynamic Modeling and Expert Systems in Wastewater Engineering (págs.1-38). Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, Estados Unidos.

[13] Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlap, P.V.; Clark, D.P. (2009). Brock, biología de los microorganismos. Pearson Addison Wesley, 12ª ed., Madrid.

[14] Metcalf & Eddy (1991). Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. McGraw-Hill, Inc., 3ª ed., Nueva York, Estados Unidos.

[15] Mota, C.; Ridenoure, J.; Cheng; De los Reyes, F. (2005). High levels of nitrifying bacteria in intermittently aerated reactors treating high ammonia wastewater. FEMS Microbiol. Ecol., núm. 54, págs. 391-400.

[16] Salvado, H.; Gracia, M.P. (1993). Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis. Water Res., núm. 27, págs. 891-895.

[17] Schramm, A.D.; De Beer, A.; Van den Heuvel, S.; Ottengraf, S.; Amann, R. (1999). Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microensors. Appl. Environ. Microb., núm. 65, págs. 3.690-3.696.

[18] Wells, G.; Park, H.; Yeung, C.; Eggleston, B.; Francis, C.; Criddle, C. (2009). Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of *Crenarchaea*. Environ. Microb., núm. 11(9), págs. 2.310-2.328.

[19] Zornoza, A.; Avendaño, L.; Alonso, J.L.; Serrano, S.; Amorós, I.; Bernácer, I.; Martínez, J.J. (2011). Análisis de las correlaciones entre diversos parámetros operacionales y fisicoquímicos relacionados con el proceso biológico de nitrificación en fangos activos. *Networking sobre problemática biológica en sistemas de eliminación de nitrógeno*, Sevilla, 2011.

[20] Zornoza, A.; Alonso, J.L.; Serrano, S.; Fajardo, V.; Zorrilla, F.; Bernácer, I.; Morenilla, J.J. (2010). Estudio integrado del proceso de fangos activos I. Análisis descriptivo de factores fisicoquímicos y biológicos implicados en su dinámica. VII Jornadas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo, Sevilla 2010.