



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO



FACULTAD DE INGENIERÍA

CENTRO INTERAMERICANO DE RECURSOS DEL AGUA

**EVALUACIÓN DE PROCESOS DE BAJA PRODUCCIÓN DE LODO
POR TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DEL AGUA**

PRESENTA:

FRIDA STEFANIA SILVA TREJO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CHEIKH FALL

Toluca Estado de México, Diciembre 2015.



Ciudad Universitaria, Toluca, México, a 25 de noviembre de 2015.

**FRIDA STEFANIA SILVA TREJO
P R E S E N T E.**

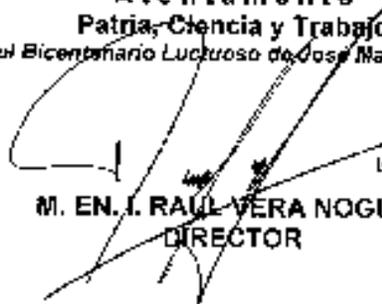
A continuación describo el tema y el capitulado aprobado por esta Institución para el desarrollo de su tesis dirigida por el Tutor Académico DR. CHEIKH FALL de la **Maestría en Ciencias del Agua**, siendo:

"EVALUACIÓN DE PROCESOS DE BAJA PRODUCCIÓN DE LODO POR TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA"

- RESÚMEN
- ABSTRACT
- 1. INTRODUCCIÓN
- 2. ANTECEDENTES
- 3. JUSTIFICACIÓN CONTEXTUAL Y CIENTÍFICA
- 4. HIPÓTESIS
- 5. OBJETIVOS
- 6. METODOLOGÍA
- 7. RESULTADOS
- 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asimismo, para la aprobación de la tesis y demás trámites deberá sujetarse al reglamento respectivo de esta Institución.

Atentamente
Patria, Ciencia y Trabajo
"2015, Año del Bicentenario Luchoso de José María Morelos y Pavón"



M. EN. I. RAUL VERA NOGUEZ
DIRECTOR


FACULTAD DE INGENIERIA
U. A. E. M.



AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento de la investigación a través del proyecto de Ciencias Básicas # 152943, “Reducción de los sólidos generados por el proceso de lodo activado: Mecanismos subyacentes y modelación dinámica de la degradación de la fracción de residuos endógenos(Xp) de los lodos”, bajo la responsabilidad del Dr. Fall.

Al **Dr. Cheikh Fall** por confiar en mí, por su apoyo y por brindarme los conocimientos necesarios para realizar este proyecto.

A **mis revisores** por sus observaciones que fortalecieron la estructura de esta investigación (Dra. Guadalupe Fonseca, Dra. Marina Islas, Dra. Mercedes Lucero y Dr. Iván Gallegos).

Al **CONACYT** por otorgarme la beca para la realización de mis estudios de maestría.

Al **Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT)** por la beca concedida durante la fase de redacción y finalización de la tesis.

A **mis compañeros y amigos de la maestría (Abad Posadas, Araceli Ríos, Alfonso García y Brenda Silva)**, gracias por la amistad y el apoyo mutuo que se dio entre nosotros durante el posgrado.

DEDICATORIA

A mi familia que me ha brindado su apoyo, la cual quiero mucho, en especial a:

*Mi abuelita Ofelia Benitez, por su apoyo incondicional, por ser una mamá y abuelita ejemplar y por su cariño.

*Mi abuelita Sofía Macedo (finada), por la fortaleza que tuvo en vida, por su sencillez y su gran cariño.

*Mi papá Gatón Silva, por quien siento un cariño infinito, y aunque pensamos, comemos y actuamos muy diferente, fue mi compañero en la cloaca, la vida nos enseñó a ser fuertes y hemos podido salir adelante.

*Mis hermanos Aldo Silva e Ivonne Silva, que son mi motivación, siempre querré que estén bien y que nada les falte.

*Mi mamá Etna Trejo (finada), por haberme dado la vida, por todo el cariño que me brindo en vida y por haber sido una mujer fuerte y trabajadora.

*Mi tío Joaquín Trejo (Güerito), por su trato que me hizo sentir valiosa, por el cambio que le dio a mi vida, por ser como la mamá que no tuve, espero pronto regrese el brillo en sus ojos.

*Mis nenes (Yuju, Yupi, Tlilo, Valentino, Siouxsie, Peperoni, Gatito (el Guerrero), Luz, Nina, Runa, Coffe, Canica y Chofiz) y a los perros de la calle que son seres admirables, su vida es un lucha constante y ahora el ayudarlos es una de mis mas grandes motivaciones.

A todos mis amigos que han estado en los buenos y malos momentos, en especial a:

*Alfonso Gómez, por su apoyo incondicional y cariño, por la música que emanaba en nuestros sueños lucidos, por esos dos años que nos procuramos y por haber sido un angelito en mi camino.

*Mario Leyva, por esa gran amistad que fue una sorpresa en mi vida, por su sonrisa ejemplar que contagia, por ser guerrero, por el cariño que le tiene a los animales, por la sencillez con que lleva su vida y por ser mi equipo.

*Alan Reyes, por ser mi mejor amigo, por todos esos años que pasamos juntos, por las retas tan reñidas de básquet que nos echamos, por los bailongos tan originales que se nos ocurrían, por toda la buena música que me compartió y por el apoyo que me brindo durante años.

LEMA

“No hay donde anclar la balsa, ¡tal vez es porque ella no sabe estar en un lugar!, navegar es su destino incierto, mientras que el viento peina las veredas en el agua, alguna orilla la está esperando sin darse cuenta”.

*Anonimo

ABREVIATURAS

LA	lodos activados
EF	espectroscopía de fluorescencia
CMF	citometría de flujo
DQO	demanda química de oxígeno
DQO _{soluble}	demanda química de oxígeno soluble
DQO _{total}	demanda química de oxígeno total
DQO _x	demanda química de oxígeno particulada
DBO	demanda bioquímica de oxígeno
SSV	sólidos suspendidos volátiles
SSF	sólidos suspendidos fijos
SST	sólidos suspendidos totales
rO ₂	tasa de consumo de oxígeno en el tiempo
μ_{Hmax}	tasa máxima específica de crecimiento de la biomasa heterótrofa
b _H	constante o coeficiente de decaimiento de la biomasa heterótrofa (muerte-regeneración)
b' _H	constante de decaimiento de la biomasa heterótrofa (respiración endógena)
Y _H	coeficiente de rendimiento heterotrófico
f _p	fracción de biomasa transformada en materia particulada durante el decaimiento
C	constante estequiométrica con nitrificación
f _N	fracción de biomasa nitrificante

S_s	fracción de DQO fácilmente biodegradable
S_o	concentración de oxígeno disuelto
S_i	materia orgánica no biodegradable soluble
X_s	fracción de DQO lentamente biodegradable
X_i	materia orgánica no biodegradable particulada
X_H	biomasa heterótrofa
X_A	biomasa autótrofa
X_P	residuos inertes de biomasa muerta

RESUMEN

El proceso biológico de lodos activados (LA) se basa, en que la materia orgánica de las aguas residuales se oxida y se transforma en biomasa microbiana, sin embargo, consume mucha energía y genera una gran cantidad de biosólidos. La reducción de esta producción de lodos en exceso es uno de los retos más serios en el tratamiento de aguas residuales biológicas.

Esta investigación es parte de un proyecto enfocado en el estudio de la minimización de lodos, en el que se busca utilizar técnicas que llevan a una menor producción de lodos, mediante tratamientos que pueden lisar las células biológicas, liberando materia orgánica que puede volver a ser biodegradada. Un punto importante del proyecto fue valorar la utilización de técnicas de medición de biomasa por fluorescencia, citometría, espectrofluorimetría y microscopía de fluorescencia para evaluar el desempeño de procesos de minimización de lodo activado (uno por digestión aerobia y otro por ozonación). En todos los casos se utilizó un kit de tinción para discernir entre las fracciones de bacterias vivas y muertas, mismas que se relacionaron con la reducción de biomasa en los lodos tratados.

En la técnica de citometría de flujo (CMF), se logró configurar el equipo para detectar las poblaciones vivas versus muertas, así como las perlas de conteo (estándar), pero no se pudieron tener más avances por fallas en el equipo, esto pudo originarse por una contaminación y/o obstrucción de los conductos del citómetro por los flocs del lodo, aunque el lodo ya había sido segregado por tratamientos de ultrasonido. Ante esta limitación, la investigación se enfocó en el uso de una técnica alterna basada en la espectroscopía de fluorescencia.

Para el digestor aerobio, se buscó seguir el decaimiento de microorganismos en el tiempo, por respirometría y medición de DQO por un lado, versus espectroscopía de fluorescencia (poblaciones vivas/muertas). En el proceso de ozonación, se trató de comparar las cantidades de biomasa viva que quedaban en función de las dosis de ozono aplicadas al lodo. En este último caso, se dio seguimiento al incremento de la biomasa viva durante un experimento de crecimiento de la misma, tanto por respirometría como por espectrofluorimetría.

El licor utilizado en el estudio de digestión aerobia fue un lodo modelo cultivado en el laboratorio, en dos reactores batch secuenciales (RBS) de 30 L, alimentados con agua residual sintética a base de acetato de sodio. El lodo utilizado en el proceso de ozonación provino de la planta Toluca Norte (PTN). La operación y seguimiento de los reactores para producir el lodo modelo se hizo durante varios meses como parte de esta tesis y otras relacionadas a ella. En lo particular, con la técnica de tinción y la microscopía de fluorescencia, se observó que los floculos formados son muy compactos y están conformados por bacterias de formas esféricas

Con base en los datos de respirometría y DQO, se determinó la tasa de decaimiento heterótrofo (b_H) en el digestor aerobio de lodo activado (LA) y la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{Hmax}) en un lodo tomado de la Planta Toluca Norte que fue ozonado.

El valor de b_H estimado, en el digestor aerobio con AQUASIM fue de 0.23 d^{-1} (base muerte-regeneración). En el caso de μ_{Hmax} se obtuvo un valor de 11.4 d^{-1} tras ozonar, comparado a 3.9 d^{-1} en el lodo no ozonado. Aparentemente la ozonación ocasionó una selección de bacterias resistentes al ozono y con mayor tasa de crecimiento. En general, los resultados obtenidos por espectrofluorometría tuvieron una buena correlación con los datos de respirometría y DQOx (particulada), por lo que resultó ser una buena técnica para valorar la minimización de lodos, excepto cuando se generó mucho material soluble en el lodo tratado como es el caso de la ozonación, ya que este puede liberar nuevos productos microbianos fluorescentes que sesgan las mediciones.

ABSTRACT

An activated sludge (LA) biological process is based on oxidation of organic matter and its transformation to microbial biomass. However, it consumes too much energy and generates a great deal of biosolids. Excess sludge reduction in this kind of processes is one of the biggest challenges in biological wastewater treatments.

This research is part of a project focused on sludge minimisation, which aims to implement low sludge production techniques by means of lysing biological cells, thus releasing organic matter that can be biodegraded once again. An important part of the project was evaluating the use of biomass measurement techniques such as fluorescence, cytometry, spectofluorometry and fluorescence microscopy; in order to evaluate sludge minimisation processes performance (aerobic digestion and ozonation respectively). In all cases, a staining kit was used to discriminate between live and dead bacteria fractions, which were related with biomass reduction on treated sludge.

In the flow cytometry technique, the equipment was configured to detect live vs dead populations, as well as stabilizing droplets (standard). However, advances were not obtained due to faulty equipment. This could have been originated for sludge floc pollution and/or obstruction on the cytometer detector, even if the sludge had been secreted by ultrasound systems. Facing this constraint, the research was focused on the use of an alternative technique based on fluorescent spectroscopy.

For the aerobic digester, microorganisms decay through time was intended, on one hand, to follow by means of respirometric methods and COD measuring system, and in the other hand fluorescent spectroscopy (live/dead populations). In the ozonation process, a comparison of the remaining living biomass depending on the ozone doses applied on the sludge was attempted. In the latter case, monitoring measures on the biomass increase were taken during a growth experiment carried out through both respirometry and spectofluorometry.

It was a Sequencing-Batch-Reactor (SBR) liquor cultivated in laboratory in two 30-litre SBRs that was used in the aerobic digestion study, fed with sodium acetate synthesised wastewater. The sludge used in the ozonation process came from *Toluca Norte* Wastewater Treatment Plant (known in Spanish as PTN). The reactor operation and monitoring to produce the analysed sludge was carried out during several months as part of this and other related theses. In particular, the staining technique and the fluorescence microscopy showed that the formed floccules are very compact and that they are formed by spherical bacteria.

According to the respirometry and COD data, the decay rate of heterotrophic biomass (b_H) in the activated sludge (AS) aerobic digester and the maximum specific heterotrophic growth rate (μ_{Hmax}) were determined in sludge taken from *Toluca Norte* Wastewater Treatment Plant that was ozonated.

The estimated b_H value in the aerobic digester using AQUASIM was 0.23 d^{-1} (death-regeneration basis). With respect to μ_{Hmax} a value of 11.4 d^{-1} was obtained. In general, the spectofluorometry results were well correlated with the respirometry and COD (particulate) data. This resulted in a proper technique to assess the sludge minimisation, except for soluble material generation during the treated ozonated sludge, since it can release new fluorescent microbial products which bias the measurements.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	II
LEMA.....	IV
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTE.....	5
2.1. Procesos de minimización de lodos.....	5
2.2. Modelo ASM1 y el fraccionamiento de la DQO.....	5
2.3. Procesos de crecimiento y decaimiento de microorganismos heterótrofos en el modelo ASM.....	6
2.3.1. Crecimiento aerobio de los microorganismos heterótrofos.....	6
2.3.2. Decaimiento o muerte de los microorganismos heterótrofos.....	7
2.4. Citometría de flujo (CMF).....	8
2.4.1. Aplicaciones de la CMF en la microbiología.....	8
2.4.2. CMF en lodos activados.....	8
2.4.3. Principios básicos de la citometría de flujo.....	9
2.5. Espectroscopía de fluorescencia (EF).....	10
2.5.1. Aplicaciones de la espectrofluorimetría.....	10
2.5.2. Espectroscopía en lodos activados.....	11
2.5.3. Principios de la espectrofluorimetría.....	12
3. JUSTIFICACIÓN CONTEXTUAL Y CIENTIFICA.....	15
4. HIPOTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	16
5.1. Objetivo general.....	16
5.2. Objetivos específicos.....	16
6. METODOLOGÍA.....	19
6.1. Etapa I: Cultivo de lodo modelo y monitoreo de reactores.....	19
6.1.1. Prueba de sedimentación.....	21
6.1.2. Análisis de diámetro de la partícula.....	21
6.1.3. Observación de los flocs en el lodo activado por microscopía de fluorescencia.....	21
6.2. Etapa II: Seguimiento de la minimización de lodos.....	22
6.2.1. Origen del lodo.....	23
6.2.2. Medición de la rO_2 por respirometría.....	24

6.2.2.1.	Procedimiento para la medición de la tasa de consumo de O_2 en el digestor aerobio	25
6.2.2.2.	Procedimiento para la medición de la tasa de consumo de O_2 en las muestras de lodo tratado con ozono.....	26
6.2.3.	Medición de las poblaciones de bacterias vivas y muertas por citometría de flujo.....	28
6.2.3.1.	Preparación de las muestras control.....	28
6.2.4.	Procedimiento para las mediciones del porcentaje de bacterias vivas y muertas por espectroscopía de fluorescencia.....	29
6.2.4.1.	Curva de calibración.....	30
6.2.5.	Modelado y estimación de parámetros (b_H).....	30
7.	RESULTADOS.....	33
7.1	Etapa I: Cultivo de lodo modelo y monitoreo de reactores.....	33
7.1.1.	pH, temperatura, conductividad eléctrica y turbidez.....	33
7.1.2.	Sólidos y relación IVT (SSV/SST).....	34
7.1.3.	Resultados de DQO y de la relación IQV (DQO/SSV).....	35
7.1.4.	Resultados de índice volumétrico de lodos (IVL).....	37
7.1.5.	Pruebas de sedimentación	38
7.1.6.	Análisis de diámetro de la partícula.....	40
7.1.7.	Imágenes de los flocs en el lodo activado por microscopía de fluorescencia...44	
7.2.	Etapa II: Seguimiento de la minimización de lodos.....	44
7.2.1.	Seguimiento del digestor aerobio por rO_2 y DQO en AQUASIM, y por espectroscopía de fluorescencia.....	44
7.2.1.1.	Mediciones de la DQO, pH y nitratos en la digestión aerobia.....	44
7.2.1.2.	Mediciones de la rO_2 de la digestión aerobia por respirometría para el cálculo de la constante cinética b_H	46
7.2.1.3.	Modelación, análisis de sensibilidad y estimación de parámetros en AQUASIM.	50
7.2.1.3.1.	Características y modelado de los respirogramas.....	50
7.2.1.3.2.	Análisis de sensibilidad y estimación de los parámetros.....	51
7.2.1.4.	Medición del porcentaje de bacterias vivas y muertas de la digestión aerobia por espectroscopía de fluorescencia.....	53
7.2.2.	Valoración de la minimización de lodos en base a la rO_2 en un lodo modelo tratado con diferentes concentraciones de ozono por DQO, respirometría y espectroscopía de fluorescencia	59
7.2.2.1.	Mediciones de la DQO para la valoración de la minimización de lodos en un lodo modelo tratado con diferentes concentraciones de ozono.....	59
7.2.2.2.	Mediciones de la rO_2 para la valoración de la minimización de lodos en un lodo	

	modelo (PTN) tratado con diferentes concentraciones de ozono.....	60
7.2.2.3.	Mediciones del porcentaje de bacterias vivas espectroscopía de fluorescencia en un lodo modelo tratado con diferentes concentraciones de ozono.....	63
7.2.3.	Determinación de la constante cinética μ_{Hmax} (crecimiento) en el proceso de minimización de lodos en un lodo (PTN) ozonado por espectrofluorimetría vs respirometría.....	65
7.2.3.1.	Mediciones de la rO_2 en un lodo modelo ozonado por respirometría para el cálculo de la constante cinética μ_{Hmax}	65
7.2.3.2.	Medición del porcentaje de bacterias vivas y muertas en un lodo ozonado por espectroscopía de fluorescencia.....	67
7.3.	Citometría de flujo (CMF).....	71
7.3.1.	Afinación del citómetro.....	71
8.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	78
8.1.	Conclusiones	78
8.2.	Recomendaciones.....	79
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.4.1.	Funcionamiento de la CMF(Salgado, 2002).....	10
Figura 2.5.1.	Diagrama de Jablonski, en donde se puede ilustrar el proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de la luz.....	12
Figura 2.5.2.	Diagrama del funcionamiento de un espectrofluorómetro.....	13
Figura 6.1.1.	Imagen del Reactor de Lodos Activados tipo Batch de 30L, instalado en el Laboratorio de Calidad del Agua del CIRA.....	19
Figura 6.2.1.	Respitometro instalado en el laboratorio de calidad del agua del CIRA.....	25
Figura 6.2.3.	Metodología para el lavado del licor.....	28
Figura 6.2.4.	Metodología para la tinción de las muestras control.....	28
Figura 7.1.1.	Graficas de las pruebas de sedimentación en el reactor A y B a principios de octubre del 2014 hasta finales de enero del 2015.....	39
Figura 7.1.2.	Histogramas del diferencial de volumen promedio en el reactor A y B, a diferentes fechas del año 2013.....	41
Figura 7.1.3.	Histogramas del diferencial de volumen promedio en el reactor A y B a diferentes fechas del 2014.....	42
Figura 7.1.4.	Imágenes de microscopia de fluorescencia de una muestra de licor del reactor A teñido con SYTO 9 y Yodurode propidio.....	44
Figura 7.2.1.	Grafica de la tasa de consumo de oxigeno del digestor aerobio respecto al tiempo en días	47
Figura 7.2.2.	Logaritmo natural de la grafica de la tasa de consumo de oxigeno del digestor aerobio respecto al tiempo en días.	47
Figura 7.2.3.	Grafica con los datos de r_{O_2} y DQOx obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.....	49
Figura 7.2.4.	Regresión lineal con los datos de r_{O_2} vs DQOx obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.....	49
Figura 7.2.5.	Imagen de las ventanas donde se ingresan las variables, los compartimentos, los procesos y las ligas en AQUASIM.....	50
Figura 7.2.6.	Respirograma donde se muestra la curva de DQOx medido vs DQOx del modelo	51
Figura 7.2.7.	Respirograma donde se muestra la curva de r_{O_2} medido vs r_{O_2} del modelo.....	51
Figura 7.2.8.	Análisis de sensibilidad de b_H , ini_{XH} e ini_{XP} utilizando los datos de r_{O_2} medido en AQUASIM.....	52
Figura 7.2.9.	Análisis de sensibilidad de b_H , ini_{XH} e ini_{XP} utilizando los datos de DQOx medido en AQUASIM.....	53

Figura 7.2.10.	Intensidad de fluorescencia de los diferentes estándares de células muertas y vivas en el LA.....	54
Figura 7.2.11.	Curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas con la corrección de Fa (75%).	55
Figura 7.2.12.	Grafica con los datos de DQOx y % vivos obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.....	57
Figura 7.2.13.	Regresión lineal con los datos de DQOx vs % vivos obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.....	57
Figura 7.2.14.	Grafica con los datos de % Vivos y rO ₂ obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.....	58
Figura 7.2.15.	Regresión lineal con los datos de % vivos vs rO ₂ obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.....	58
Figura 7.2.16.	Grafica con los datos de rO ₂ y DQOx obtenidos en los diferentes tratamientos con ozono (0,1 ,3 y 5 minutos) del día 14 de enero del 2015.....	61
Figura 7.2.17.	Regresión lineal con los datos de rO ₂ vs DQOx obtenidos en los diferentes tratamientos con ozono (0,1 ,3 y 5 minutos) del día 14 de enero del 2015.....	61
Figura 7.2.18.	Grafica con los datos de rO ₂ y DQOx obtenidos en los diferentes tratamientos con ozono (0,1 ,3 y 5 minutos) del día 23 de enero del 2015.....	62
Figura 7.2.19.	Regresión lineal con los datos de rO ₂ vs DQOx obtenidos en los diferentes tratamientos con ozono (0,1 ,3 y 5 minutos) del día 23 de enero del 2015.....	62
Figura 7.2.20.	Intensidad de fluorescencia de los diferentes estándares de células muertas y vivas del lodo PTN, para la valoración de los tratamientos a 0,1 ,2 ,3 ,4 y minuto de ozonación.....	63
Figura 7.2.21.	Curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas en el lodo PTN para la valoración de los tratamientos a 0,1 ,2 ,3 ,4 y 5 minutos de ozonación.....	64
Figura 7.2.22.	Curva respirometrica para la prueba de μ_{Hmax} para el lodo ozonado a 5 minutos	65
Figura 7.2.23.	Respirograma de la curvas de crecimiento a 20°C para determinar μ_{Hmax}	66
Figura 7.2.24.	Intensidad de fluorescencia de los diferentes estándares de células muertas y vivas en el lodo de la PTN para la valoración de μ_{Hmax} en el tratamiento de 5 minutos de ozonación.....	68
Figura 7.2.25.	Curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas del lodo PTN.....	69
Figura 7.2.26.	Grafica con los datos de % Vivos y rO ₂ obtenidos del lodo tratado a 5 minutos de ozonación.....	70

Figura 7.2.27.	Regresión lineal con los datos de % vivos y rO_2 obtenidos del lodo tratado a 5 minutos de ozonación.....	71
Figura 7.3.1.	Diagrama de 2 parámetros, e histograma de la preparación 5.....	72
Figura 7.3.2.	Diagrama de 2 parámetros, e histograma de la preparación.....	73
Figura 7.3.3.	Diagrama de 2 parámetros, e histograma de la preparación 2.....	74
Figura 7.3.4.	Diagramas de 2 parámetros de la preparación 3.....	75
Figura 7.3.5.	Histogramas de la preparación 3.....	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 6.1.1.	Duración de las etapas del ciclo de mantenimiento de los reactores de lodos activados.....	20
Tabla 6.1.2.	Agua concentrada del efluente sintético.....	20
Tabla 6.2.1.	Frecuencia de mediciones de los parámetros en el digestor aerobio respecto al tiempo.....	22
Tabla 6.2.2.	Matriz con la representación del proceso decaimiento en el modelo ASM1.....	31
Tabla 7.1.1	Valores promedio, desviación estándar (DE), máximos y mínimos del pH, temperatura, conductividad y turbidez en el reactor A y B de enero a mayo del 2014.....	33
.Tabla 7.1.2.	Valores promedio, desviación estándar (SD), máximos y mínimos de los SST, SSV e IVT, en los reactores A y B del mes de agosto y septiembre del 2013.....	34
Tabla 7.1.3.	Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de los SST, SSV e IVT, en los reactores A y B en el 2014	35
Tabla 7.1.4.	Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de la DQO y el IQV, en el reactor A y B del mes de agosto y septiembre del 2013.....	36
Tabla 7.1.5.	Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de la DQO y el IQV, en los reactores A y B en el 2014.....	36
Tabla 7.1.6.	Rangos de IVL sugeridos por Sperlíng para valorar la sedimentabilidad.....	37
Tabla 7.1.7.	Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos del volumen sedimentado, los SST y el IVL, en el reactor A y B del mes de agosto y septiembre del 2013.....	37
Tabla 7.1.8.	Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos del volumen sedimentado, los SST y el IVL, en el reactor A y B en el 2014.....	38
Tabla 7.1.9.	Valores promedio de la media, mediana, moda y desviación estándar de los diámetros de la partícula, en los reactores A y B a diferentes fechas del año 2013.....	43
Tabla 7.1.10.	Valores promedio de la media, mediana, moda y desviación estándar de los diámetros de la partícula, en los reactores A y B a diferentes fechas del año 2014	43
Tabla 7.2.1.	Valores de DQO del digestor aerobio respecto al tiempo.....	45
Tabla 7.2.2.	Valores de pH y Nitratos del digestor aerobio respecto al tiempo.....	45
Tabla 7.2.3.	Mediciones de consumo de oxígeno del digestor aerobio en el reactor YS1 y YS2	46
Tabla 7.2.4.	Tabla con los cálculos de b_H vs b_H prima.....	48
Tabla 7.2.5.	Comparación de b_H (d^{-1}) a 20°C.....	48

Tabla 7.2.6.	Estimación de las variables constantes utilizando los datos de DQOx medido y rO ₂ medido en AQUASIM.....	51
Tabla 7.2.7.	Relación de integración de la fluorescencia em1 (vivas) y em2 (muertas), con la de la biomasa viva de 75%.....	54
Tabla 7.2.8.	Ecuación de la recta de la curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas con la corrección de Fa (75%).....	55
Tabla 7.2.9.	Resultados de emisiones de onda, integración de la fluorescencia y % de microorganismos vivos en el digestor aerobio en base al análisis de espectroscopía de fluorescencia.....	56
Tabla 7.2.10.	Valores de DQO total en los diferentes tratamientos con ozono.....	59
Tabla 7.2.11.	Valores de DQO soluble en los diferentes tratamientos con ozono.....	59
Tabla 7.2.12.	Mediciones de consumo de oxígeno de lodo modelo tratado a diferentes tiempos de ozonación.....	60
Tabla 7.2.13.	Relación de integración de la fluorescencia em1 (vivas) y em2 (muertas) del lodo PTN para la valoración de los tratamientos a 0,1 ,2 ,3 ,4 y 5 minutos de ozonación	63
Tabla 7.2.14.	Ecuación de la recta de la curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas en el lodo PTN para la valoración de los tratamientos a 0,1 ,2 ,3 ,4 y 5 minutos de ozonación.....	64
Tabla 7.2.15.	Resultados de la integración de fluorescencia y porcentaje de vivos en los diferentes tratamientos con ozono.....	64
Tabla 7.2.16.	Valores de $\mu_{Hmax}-b^{\prime}H$ obtenidos del respirograma para el lodo ozonado a 5 minutos.....	66
Tabla 7.2.17.	Comparación de valores de μ_{Hmax} (d ⁻¹) a 20°C.....	67
Tabla 7.2.18.	Relación de integración de la fluorescencia em1 (vivas) y em2 (muertas) del lodo PTN para la valoración de μ_{Hmax} en el tratamiento de 5 minutos de ozonación...	68
Tabla 7.2.19.	Ecuación de la recta de la curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas del lodo PTN tratado a 5 minutos de ozonación.....	69
Tabla 7.2.20.	Resultados de la integración de fluorescencia y porcentaje de vivos en el lodo tratado a 5 minutos de ozonación.....	69
Tabla 7.3.1.	Presencia y ausencia de las preparaciones control en los diagramas.....	72
Tabla 7.3.2.	Parámetros para la ubicación en el diagrama de la preparación 5.....	72
Tabla 7.3.3.	Parámetros para la ubicación en el diagrama de la preparación 1.....	73
Tabla 7.3.4.	Parámetros para la ubicación en el diagrama de la preparación.....	73
Tabla 7.3.5.	Parámetros para la ubicación en los diagramas de la preparación 3.....	74

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El proceso biológico de lodos activados (LA) se basa en que la materia orgánica de las aguas residuales se oxida y se transforma en biomasa microbiana, mediante una amplia gama de microorganismos (Rodríguez, 2010). Es un proceso muy eficiente, sin embargo consume mucha energía y genera bastante biomasa heterótrofa mediante la biodegradación de materia orgánica. La reducción de esta producción de lodos en exceso es uno de los retos más serios en el tratamiento de aguas residuales biológicas (Chen et al., 2003). Se busca utilizar métodos que tengan una baja producción biológica de lodos, mediante tratamientos que pueden matar y lisar las células, liberando materia orgánica que puede ser aún más biodegradada, o que solo pueden dañar a los microorganismos que llevan la energía a reacciones de desacoplamiento, donde la energía se produce en reacciones catabólicas biológicas hacia funciones de mantenimiento y reparación, en vez de ser conducida hacia la producción de biomasa (Liu, 2003; Liu y Tay, 2001).

Uno de los modelos más utilizados para diseñar lodos activos es el de McCarty y Lawrence (1970). Dicho modelo considera un régimen estacionario y la DBO₅ (demanda bioquímica de oxígeno) o DQO (demanda química de oxígeno) total como parámetro de caracterización. En los modelos dinámicos más recientes (modelos de lodos activados ASM 1, 2 y 3), la adopción de la DQO como componente modelo para el sustrato, mejoró la comprensión del proceso de lodos activados. La materia orgánica es muy heterogénea en los lodos activados, esta puede representarse en dos grupos de compuestos que tienen una diferencia muy marcada en sus tasas de degradación (Dold et al., 1980), la fracción de DQO fácilmente biodegradable (S_s) y su contraparte lentamente biodegradable (X_s). Por otro lado la materia orgánica no biodegradable consta de dos fracciones que son la particulada (X_i) y otra que es soluble (S_i).

Para la calibración del modelo ASM1, se requiere de la estimación de parámetros cinéticos, entre los cuales destacan la tasa máxima de crecimiento heterotrófico (μ_{Hmax}) y el coeficiente de decaimiento de biomasa heterotrófica (b_H). Comúnmente la obtención de μ_{Hmax} y b_H se realiza con base en la técnica de respirometría (Spangers et al., 1996; Fall et al., 2012), midiendo el consumo de oxígeno en una prueba batch en condiciones de una alta relación de S/M (comida/microorganismos) (Método de Kappeler y Gujer 1992).

En el presente trabajo, se propuso la utilización de otro método basado en mediciones de fluorescencia para seguir el crecimiento y decaimiento de la biomasa.

Los métodos de fluorescencia que incluye la citometría de flujo, la espectroscopía de fluorescencia y la microscopía de fluorescencia son de más en más utilizadas en el área de tratamiento de agua. La citometría se utiliza como método alterno para contar bacterias y diferenciar entre la fracción

viva y la fracción muerta (Foladori et al., 2010). La espectrofluorimetría es utilizada para estudiar los productos microbianos solubles en los procesos de tratamiento de agua (Esparza-Soto et al., 2011). Existen también métodos de fluorescencia que utilizan diferentes espectrofluorómetros para distinguir y cuantificar la fracción de biomasa viva vs muertas. Al teñir las muestras de sólidos biológicos con los fluoró cromos es posible observar la estructura de la biomasa en un microscopio de fluorescencia (BacLight, 2004).

El presente trabajo se desarrolló en el marco de un proyecto de investigación más amplio sobre el desarrollo de un proceso de LA de baja producción de lodo. Se utilizaron tres técnicas de fluorescencia (citometría de flujo, espectroscopía de fluorescencia y microscopía de fluorescencia) para evaluar el desempeño de procesos de baja producción de lodo operado en el laboratorio. No se logró implementar de forma consistente la primera técnica debido a problemas con el equipo que se disponía. En el trabajo se continuó utilizando la técnica alterna de espectrofluorimetría, en la que se utilizó el mismo kit de tinción que se había comprado para el citómetro de flujo.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

Las técnicas para la reducción de los lodos en plantas de tratamiento de agua se basan en procesos físicos, biológicos, mecánicos, térmicos, químicos, oxidativos, etcétera., que suelen causar la lisis de los microorganismos presentes en los lodos. Este efecto ha sido estudiado por técnicas que tienen crecientes aplicaciones como es la citometría, la espectrofluorometría, la microscopía y la respirometría; en las tres primeras técnicas se mide la intensidad relativa de la fluorescencia de las células en tiempo real (Rodríguez, 2010), y la cuarta se basa en la medición del consumo de oxígeno por parte de estos microorganismos (Spangers y Vanrolleghem, 1995). A continuación se presenta el estado del arte sobre estos temas. presentación

2.1. Procesos de minimización de lodos

Hoy en día, existe toda una nueva línea de investigación para el desarrollo de nuevos procesos de minimización de lodo en el seno mismo del proceso de fango activado (Rodríguez, 2010), donde se actúa sobre el lodo de retorno para minimizar la producción de sólidos. Las investigaciones, se enfocan en el desarrollo de diferentes variantes de procesos (físicos, biológicos y químicos), pero también hay muchos esfuerzos para entender los mecanismos de reducción de masa (Aragón, 2009).

En este contexto la citometría de flujo (CMF) y la espectrofluorometría se identificaron como una herramienta con gran potencial para entender la minimización de lodos, sin embargo, hasta ahora fue muy poco explorado (Foladori, et al., 2012a). También requiere de mucha práctica para su adaptación al campo de los procesos biológicos.

2.2. Modelo ASM1 y el fraccionamiento de la DQO

Uno de los modelos más conocidos y utilizados para diseñar fangos activos es el de McCarty y Lawrence (1970). Dicho modelo considera un régimen estacionario y la DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) o DQO total como parámetro de caracterización. Hoy en día existen cuatro generaciones de modelos dinámicos de la IWA (Henze et al., 2002): el ASM1 original y el muy reciente ASM3, capaces de predecir la degradación de la materia orgánica, nitrificación y desnitrificación, y el ASM2 y su versión modificada ASM2d que incluye además la eliminación biológica del fósforo (Fall et al., 2006). Ahora con esta serie de modelos ASM, es posible realizar la modelación dinámica de plantas de tratamiento de aguas residuales por lodos activados; lo que también ayuda para un mejor entendimiento del proceso y mejora el diseño, los diagnósticos y trabajos de optimización (Rodríguez et al., 2012).

En los modelos ASM, la adopción de la DQO como componente modelo para el sustrato, mejoró la comprensión del proceso de fangos activados.

La materia orgánica es muy heterogénea, siendo formada por una larga gama de compuestos, puede representarse dividiéndola en dos grupos de compuestos que tienen una diferencia muy marcada en sus tasas de degradación (Dold et al., 1980), la fracción de DQO fácilmente biodegradable (S_s) y su contraparte lentamente biodegradable (X_s). Por otro lado la materia orgánica no biodegradable consta de dos fracciones que son la particulada (X_i) y otra que es soluble (S_i).

Con base en el fraccionamiento de la DQO y a los procesos de transformación, el ASM1 identifica seis tipos de componentes particulados que forman el lodo. Estos son: la biomasa heterótrofa (X_H) y autótrofa (X_A); los residuos inertes de biomasa muerta (X_P); La materia orgánica inerte (X_I) y la inorgánica X_S (despreciable en general). Esta clasificación es la base de los principios de todas las propuestas de procesos de reducción de masa, las cuales buscan enfocarse sobre uno o varios de los componentes individuales.

En este contexto, por ser una técnica de conteo y clasificación de tipos de partículas y células (Orfao y Ruíz, 1996), se espera que la CMF pueda ayudar a evaluar y estudiar los procesos de minimización de lodos. De forma alterna se espera el mismo potencial utilizando espectroscopía de fluorescencia y microscopía de fluorescencia, donde se utilizan los mismos kits de tinción para el conteo de bacterias vivas y muertas.

2.3. Procesos de crecimiento y decaimiento de microorganismos heterótrofos en el modelo ASM1

2.3.1. Crecimiento aerobio de los microorganismos heterótrofos

Se considera que la materia orgánica fácilmente biodegradable (S_s) interviene en el crecimiento de los heterotróficos. X_s sufre una hidrólisis tardada antes de que pueda transformarse en S_s y ser utilizado por los microorganismos. El crecimiento se modela utilizando la estructura del modelo de Monod donde pueden ser limitantes tanto S_s como S_o , (oxígeno). Este proceso es el que más contribuye en la remoción de la DQO, producción de biomasa nueva y demanda de oxígeno. La principal constante de velocidad es μ_{Hmax} (Tasa máxima de crecimiento heterótrofo) (Fall et al., 2012).

La tasa máxima de crecimiento heterótrofo (μ_{Hmax}), varía con la cantidad de sustrato presente en el reactor. Con alto sustrato dentro del medio, la tasa de crecimiento alcanza un valor máximo y constante. En cambio cuando el sustrato es limitante la tasa se reduce.

Antes del ASM1, la tasa máxima de crecimiento (μ_{Hmax}) de un agua residual se determinaba clásicamente considerando la relación entre el consumo específico de sustrato y la concentración de sustrato, se expresaba a través de una ecuación de Monod (Henze et al, 2000). Pero con la introducción de los modelos matemáticos, dinámicos y los problemas para interpretar la DQO total, DBO, y las medidas de SSV, promovieron el desarrollo del método respirométrico, desarrollado por Kappeler y Gujer (1992), y comúnmente utilizado para la estimación de μ_{Hmax} .

2.3.2. Decaimiento o muerte de los microorganismos heterotróficos

El decaimiento heterotrófico en este modelo incluye todos los fenómenos de lisis, respiración endógena, muerte o depredación. Su tratamiento matemático en el ASM1 es diferente al enfoque tradicional en el cual se le atribuía directamente el consumo de oxígeno (respiración endógena). La modelación en el ASM1 utiliza la noción de muerte-regeneración, donde $X_H = X_s + X_p$ sin consumo directo de oxígeno. El consumo de O_2 esta diferido hasta después cuando el X_s se transforma en S_s , el cual se utiliza luego en el proceso de crecimiento. Por eso el valor de b_H del modelo tiene muchas diferencias con respecto al valor empleado en los modelos tradicionales ($b^{\prime}H$), El proceso de decaimiento del ASM1, no manifiesta ningún consumo directo de oxígeno, por el contrario, produce residuos inorgánicos inertes (X_p) y una DQO lentamente biodegradable (X_s). (Henze et al., 2000).

En los modelos actualmente desarrollados se emplea principalmente la respirometría para la evaluación experimental de la $b^{\prime}H$. El procedimiento propuesto por Ekama et al. (1986) es ampliamente reconocido para esta evaluación. Se trata de la medición de la tasa de consumo de oxígeno obtenido a partir de la digestión aeróbica de los lodos activados sin sustrato exterior, durante un período de varios días. Se le saca el logaritmo natural a la rO_2 respecto al tiempo y en base a la ecuación de la pendiente se obtiene el valor de b_H .

Spangers y Vanrolleghem (1996) propusieron un método para determinar el decaimiento endógeno, junto con la tasa de crecimiento de un respirograma. Sus experimentos tuvieron datos dispersos, con variaciones cíclicas a causa de la liberación secuencial y la utilización de residuos endógenos, por lo que la evaluación fue casi imposible. Se ha definido otro método respirométrico que consiste en medir los cambios en la respuesta μ_{Hmax} y X_H . El método refleja la variación de X_H con el tiempo que siempre se mantiene a un nivel constante durante el curso del experimento. Se obtuvo una significativa reducción de b_H con un valor de alrededor de 0.1 d⁻¹ a 20 °C, para las aguas residuales domésticas.

Henze et al. (2002), en una revisión más completa, afirmaron que lo que se define como descomposición endógena, podría ser en realidad un espectro de diferentes mecanismos como de mantenimiento, deterioro celular, respiración endógena, efecto de sustancias tóxicas o condiciones adversas que resultan en la lisis celular. En este sentido, las pruebas de digestión aeróbica, como el propuesto por Ekama et al. (1986), pueden estar sujetas a interferencias graves por cualquiera de las partículas externas como sustrato lentamente biodegradable, Xs con la biomasa o los productos de almacenamiento interno, incluido como un componente del modelo, en algunos modelos nuevos (Henze et al., 2002).

2.4. Citometría de flujo (CMF)

2.4.1. Aplicaciones de la CMF en la microbiología

Hasta muy recientemente, la CMF era más utilizada en análisis clínicos (sangre) y de algas. En la actualidad, los equipos, protocolos de análisis y reactivos, ofrecen mayores posibilidades para estudios con bacterias y fragmentos microbiológicos (que van desde una sola célula hasta nivel de comunidad). Sus aplicaciones incluyen estudios de ciclos celulares de bacterias, presencia microbiana en agua de mar y potable, y la evaluación de la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos (Hammes et al., 2008). La CMF también se ha utilizado para la medición del contenido de compuestos intracelulares, tales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Alcon et al., 2003). Recientemente se desarrolló y optimizó un citómetro de flujo para la detección de virus y su enumeración. Este desarrollo es de suma importancia debido a que los virus son cruciales en la dinámica bacteriana, la diversidad y la diversificación en los entornos acuáticos (Li et al., 2010). Hoy en día, existen protocolos muy estabilizados y Kits de reactivos para cuantificar las proporciones de biomasa viva, muerta y activa (Wang et al., 2010), los cuales también son usados en la espectroscopía de fluorescencia.

2.4.2. CMF en lodos activados

Hasta ahora hay muy pocas aplicaciones de la CMF para estudiar los efectos del uso de las tecnologías en la reducción de lodos en plantas de tratamiento de aguas (Foladori et al., 2010a).

Utilizando la técnica de CMF Foladori et al. (2010a) hicieron una comparación de los efectos de las tecnologías de reducción de lodo (ultrasonidos, alta presión homogenizante, tratamiento termal y ozonación), en la integridad de células bacterianas y permeabilización. Convirtieron las presiones, temperaturas y dosis de ozono en su valor equivalente de energía específica, lo cual demostró que el alcance de la interrupción completa de células bacterianas requiere niveles excesivos de energía.

Foladori et al. (2010b) propusieron una serie de pasos para cuantificar células bacterianas viables y activas dentro de las etapas principales en las plantas de tratamiento de agua, por lo que desarrollaron un procedimiento específico para convertir la dispersión de la luz medida por CMF en bio-volumen bacteriano, expresado como sólidos suspendidos volátiles (SSV) o DQO.

Vitala et al. (2011) compararon dos métodos de análisis de un cultivo, por la técnica de adenosin tri-fosfato (ATP), en muestras de agua de dos tipos (tratamiento y sistema de distribución). Tanto la CMF como el análisis de ATP describieron la microbiología de los sistemas, las variaciones en valores de ATP por célula en las muestras de agua, las cuales, las cuales fueron explicadas por las diferencias en los histogramas de las muestras por CMF.

2.4.3. Principios básicos de la citometría de flujo

Las muestras microbiológicas normalmente se analizan usando técnicas tradicionales, las cuales toman mucho tiempo para obtener resultados y no proporcionan información en tiempo real sobre el estado fisiológico del organismo *in situ* (Salgado, 2002).

La CMF es una técnica de análisis celular multiparamétrico que hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz, y características controladas como la fluorescencia (Parks y Herzenberg, 1984). Estas ideas son la base de la fluorescencia activada (FACS), que es una técnica de clasificación de células en la CMF (Scheffold y Kern., 2000). La CMF proporciona datos tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna e intensidad relativa de fluorescencia (Rieseberg et al., 2001).

El funcionamiento de la CMF consiste en la inyección de una suspensión celular donde se hace pasar una célula después de otra a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo, a través de un capilar al que traspasa un rayo láser (Beckton, 1995). Las señales luminosas son colectadas y transformadas en pulsos para contar y clasificar las células (Salgado, 2002). Cuando el rayo incide en una célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados de la célula. La luz dispersada hacia delante provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular. Además, si la célula va marcada con un fluoróforo, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro (figura 2.4.1).

Una de las formas de evaluar viabilidad es determinar la integridad de la membrana y para ello existen colorantes de exclusión o de retención. Los colorantes de exclusión tiñen los ácidos

nucleicos de las células con membranas defectuosas y los de inclusión generalmente utilizan sustratos fluorescentes que son degradados por las enzimas intracelulares y que generan productos fluorescentes (Salgado, 2002). Syto 9 es capaz de teñir todas las células (fluorescencia verde), mientras que la polaridad de Yoduro de propidio sólo penetra las células con membrana rota (fluorescencia roja), que pueden ser consideradas como muertas (Ziglio et al. 2002)

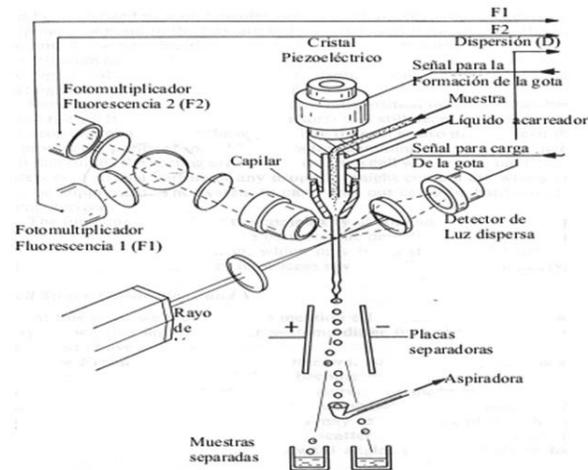


Figura 2.4.1. Funcionamiento de la CMF (Salgado, 2002).

2.5. Espectroscopía de fluorescencia (EF)

2.5.1. Aplicaciones de la espectrofluorimetría

Las aplicaciones de la fluorescencia son muy variadas y son ampliamente usadas para mediciones analíticas y de investigación científica, la mayoría de ellas se relaciona con el uso de pruebas de fluorescencia extrínseca, es decir, un cromóforo que se encuentra unido o adsorbido a otra molécula y su fluorescencia es medida (Stock, 2006). En los últimos años, la espectroscopía está siendo aplicada para estudiar los procesos físicos de moléculas; relaciones estructura –función, interacción de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, estructura y actividad dentro de una célula, así como en la detección y secuenciación del ADN, y en la detección del cáncer (Fabila, 2010). También se han desarrollado pruebas que incorporan donadores fluorescentes, aceptores no fluorescentes y combinaciones para detectar proteólisis (Stock, 2006).

2.5.2. Espectroscopía en lodos activados

Esparza et al. (2011) operaron un reactor de lodo activado a escala de laboratorio para caracterizar el efluente. El reactor fue monitoreado a tres diferentes tiempos de retención celular (TRC) (3, 8 y 28 días) y fue alimentado con agua sintética cuya fuente de carbono era glucosa más otros compuestos orgánicos ($DQO_s=200$ mg/L). Las emisiones de fluorescencia del efluente mostraron tres picos, el pico A y B localizados a una misma longitud de emisión λ_{em} (342.2-345.2 nm) pero a dos diferentes longitudes de excitación λ_{exc} (220.9-225 nm). La fluorescencia total (TF) entre el pico A/B fue de 3.0-3.4. El par de picos se identificaron por su localización en las EEMs como proteínas de productos de materia soluble (PMS) atribuidos al triptófano. El pico C se encontró en la EEM-3D a una $\lambda_{exc} / \lambda_{em}=333.8-340/415.8-433.4$, y se determinó como un ácido húmico. La intensidad de fluorescencia (IF) incrementó cuando la TRC aumentó, lo cual reveló la acumulación y generación de moléculas orgánicas fluorescentes, atribuidas a sustancias húmicas y proteínas de PMS, durante la biodegradación aerobia de la glucosa.

Li et al. (2008) determinaron sustancias intracelulares y extracelulares de un reactor secuencial batch de LA, identificando tres picos de fluorescencia, Pico A a una $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ de 280/350 nm la cual describe a las proteínas, Pico B a la $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ 340/400 nm atribuido a componentes fúlvicos (Pons et al., 2004) y Pico C a sustancias húmicas alrededor de $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ 390/450 nm. La IF de los fluoró cromos intracelulares tuvo una relación estrecha con la producción del reactor.

Saadi et al. (2006) valoraron la biodegradación de la materia orgánica disuelta (MOD) en reactores batch de los efluentes de dos plantas de aguas residuales, midieron la DQO, la absorbancia de la luz ultravioleta a 254 nm (UVA_{254}) y las matrices de excitación-emisión (EEM). Los espectros de emisión se obtuvieron a una $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ de 220 y 550 nm a 10 nm de intervalo. Tres picos de fluorescencia fueron identificados y se debieron a las sustancias húmicas (430-434/330-339 nm), fúlvicas (437-440/272-281 nm) y proteínas (348-359/281 nm). En algunos casos la IF aumentó en los efluentes a causa de la formación de nuevo material fluorescente debido a la biodegradación de la MOD y/o la degradación de componentes orgánicos que desactivan la fluorescencia de la MOD.

Ni et al. (2008) monitorearon un reactor de LA que fue alimentado con agua residual sintética (DQO de 100 mg/L) para la excitación de productos solubles (EPS) y así poder identificarlos con EEM-3D y un modelo matemático. Identificaron dos picos específicos de fluorescencia utilizando el algoritmo PARAFAC, el primero lo atribuyeron a proteínas ($\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ 280/340 nm) y el segundo a compuestos fúlvicos ($\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ 320/340 nm). Determinaron que las sustancias fúlvicas y la proteína, en la EPS, incrementaron en la fase de utilización de sustrato, pero disminuyeron en la fase endógena.

Ventura et al. (2014) caracterizaron la materia orgánica disuelta en el efluente de un reactor aerobio autotrófico nitrificante por espectrometría de fluorescencia para determinar los productos microbianos solubles de las bacterias nitrificantes. Dándose cuenta que la producción y acumulación de los productos microbianos solubles de bacterias aerobias autotróficas nitrificantes podían atribuirse a la predominación de estas mismas en el reactor, ya que son la única posible fuente de materia orgánica fluorescente.

La mayoría de las aplicaciones de la espectrofluorometría en agua residual fueron para identificar los productos microbianos solubles en los sistemas de tratamiento. Sin embargo, la técnica fue propuesta también para conteo de bacterias. Un protocolo de la compañía BacLight propone un procedimiento para lograr lo anterior (BacLight, 2004).

2.5.3. Principios de la espectrofluorometría

La fluorescencia es la propiedad de ciertas moléculas orgánicas e inorgánicas de liberar energía en forma de luz cuando son excitadas por una fuente de alta energía, la cual eleva los niveles de energía de los electrones dentro de la molécula (Esparza et al., 2014). El regreso del electrón excitado al estado fundamental produce la emisión de la fluorescencia (Fabila, 2010), ver figura 2.5.1.

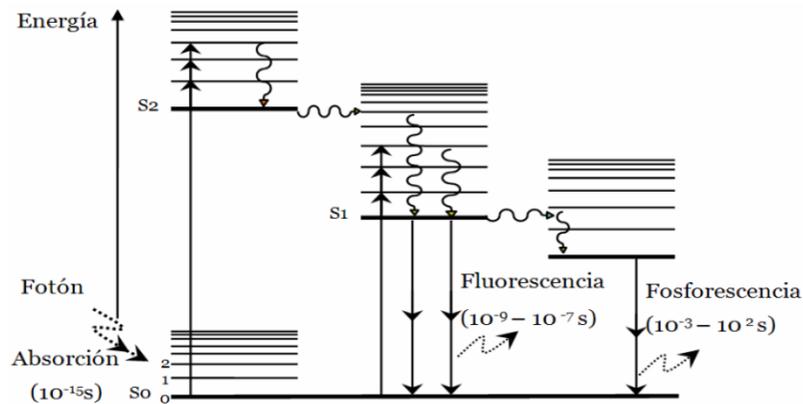


Figura 2.5.1. Diagrama de Jablonski, en donde se puede ilustrar el proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de la luz

La mayoría de los espectrofluorómetros utilizan óptica de doble haz con la finalidad de compensar las fluctuaciones en la potencia de la fuente de luz. Como se observa en el esquema de la figura 2.5.2, el haz de la fuente luz pasa primero a través de una sola longitud de onda para excitar a la muestra. La fluorescencia emitida se propaga desde la muestra en todas las direcciones, pero la que se observa es la que forma un ángulo con el haz de excitación. La radiación emitida llega a un

segundo monocromador (monocromador de emisión), el cual selecciona la longitud de onda de la fluorescencia para su medición. El haz de referencia pasa a través de un atenuador que reduce su potencia hasta un valor similar al de la radiación fluorescente. Las señales ópticas de referencia y de fluorescencia son convertidas a señales eléctricas por medio de fotodetectores, normalmente tubos fotomultiplicadores (PMT). Estas señales eléctricas procedentes de los fotomultiplicadores de referencia y de la muestra se conectan a la entrada de un amplificador diferencial cuya salida se visualiza en un dispositivo de lectura.

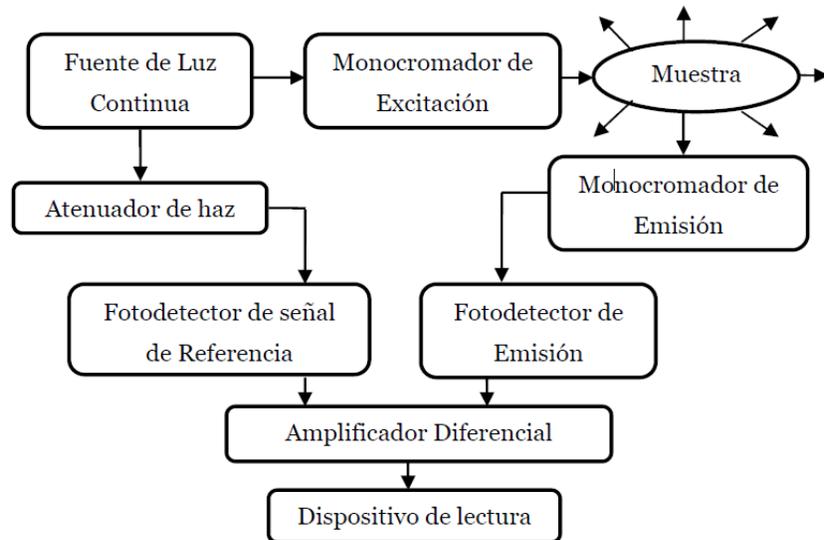


Figura 2.5.2. Diagrama del funcionamiento de un espectrofluorómetro.

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

**(JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS
Y OBJETIVOS)**

3. JUSTIFICACIÓN CONTEXTUAL Y CIENTÍFICA

El presente trabajo se realizó en el contexto de un proyecto más amplio donde se están operando y estudiando diferentes reactores de minimización de lodo activado.

Como bien se sabe, todos los municipios tienen la obligación de tratar sus aguas residuales, el Estado de México está conformado por 124 municipios, de los cuales solo 39 tratan sus aguas, esta depuración de carga contaminante se realiza en 71 plantas o sitios, donde en su mayoría (52%) se realizan procesos de tipo secundario o convencional, como es el caso del tratamiento de lodos activados. De los 39 municipios en 21 se reportan lodos residuales y solo 11 de esos 21 le dan tratamiento a los lodos producidos. El proceso de lodo activado consume mucha energía y genera grandes cantidades de lodos con un alto contenido de materia orgánica. Los lodos que se obtienen de las aguas residuales tienden a concentrar los metales pesados, microorganismos patógenos y compuestos orgánicos poco biodegradables. Esto suscita problemas tanto para el ambiente como para la salud pública. El costo del tratamiento de lodo es generalmente alto, por lo que el desarrollo de procesos que producen menos lodo es de mucho interés.

Esta tesis está enfocada en el uso de la espectrofluorimetría para evaluar el desempeño de los procesos de minimización en un ambiente aerobio y con ozono, para valorar el método de determinación de la constante b_H y μ_{Hmax} , en comparación con respirometría y mediciones de DQO.

Se pretendió usar la citometría de flujo (CMF) porque es una técnica de análisis celular multiparamétrica que mide simultáneamente múltiples características de una sola célula (tamaño, morfología, granularidad, estado fisiológico y actividad microbiana) y la clasifica para tener poblaciones definidas, pero debido a las dificultades que se tuvieron con el citómetro de flujo, se optó por usar la técnica de espectrofluorimetría para analizar las muestras, ya que tiene un alto nivel de sensibilidad y tienen un amplio rango de análisis. La técnica utiliza la misma tinción que la CMF, igual que para microscopía de fluorescencia.

En cuanto al desempeño de los procesos de baja producción de lodo, el análisis que ofrece la espectrofluorimetría permite medir el porcentaje de biomasa viva y muerta respecto al tiempo y en función del ambiente aerobio o con ozono.

En esta investigación se tuvo en cuenta la importancia de la reducción de lodos procedentes de la depuración de aguas residuales domésticas o urbanas. Como se menciona anteriormente uno de los principales objetivos de la reducción es la disminución de biomasa, la cual puede contener patógenos, esta disminución puede ser evaluada con algunas técnicas que analizan muestras microbiológicas como lo es la espectrofluorimetría, para conocer la eficiencia de la reducción en el proceso de lodos activados.

Hasta ahora las técnicas convencionales utilizadas para evaluar procesos de reducción de biomasa en lodo son respirometría y análisis de DQO. La determinación de las tasas de b_H y μ_{Hmax} fue por respirometría y DQO. La presente investigación propone innovar en el estudio de estos procesos y estas constantes a través del uso de técnicas de medición de fluorescencia.

4. HIPÓTESIS

Es posible evaluar el desempeño de procesos de minimización de lodo activado, así como hallar las constantes b_H y μ_{Hmax} con base al uso de técnicas de medición de fluorescencia.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

- Evaluar el desempeño de procesos de minimización de lodo activado por técnicas de medición de fluorescencia (espectrofluorimetría, citometría y microspía) versus métodos tradicionales (respirometría y mediciones de DQO).

5.2. Objetivos específicos:

- Producir un lodo modelo por el proceso de lodos activados en el laboratorio de calidad del agua del CIRA.
- Evaluar el uso de la citometría y microscopía de fluorescencia para el seguimiento de los procesos de minimización de lodos.
- Valorar la constante cinética b_H (tasa de decaimiento) del modelo ASM1 en un ambiente de digestión aerobio, de los procesos de minimización de lodo activado, por espectroscopía de fluorescencia, comparado con respirometría y mediciones de DQO.
- Determinar la constante cinética μ_{Hmax} (tasa de crecimiento) del modelo ASM1 de los procesos de minimización de lodo activado por espectrofluorimetría y respirometría en un lodo modelo ozonado.

- Valorar la minimización de lodos por espectroscopía de fluorescencia y por respirometría, al aplicar diferentes dosis de ozono a un lodo modelo.

METODOLOGÍA

6. METODOLOGÍA

El proyecto se dividió en dos etapas. La primera consistió en el cultivo del lodo modelo en los reactores y el monitoreo de éstos respecto al tiempo, para ver que el proceso de LA funcionara bien. La segunda etapa fue el seguimiento del digestor aerobio y con ozono por rO_2 , DQO y espectrofluorimetría, para valorar la minimización de estos lodos. Es importante hacer notar que debido a la alta carga de trabajo que implicó el cultivo del lodo modelo, varios estudiantes participamos a la vez en la operación de los reactores y su monitoreo.

6.1. Etapa I: Cultivo de lodo modelo y monitoreo de reactores

Se produjo un lodo modelo por el proceso de lodos activados en dos reactores aerobios tipo batch de 30L, instalados en el Laboratorio de Calidad del Agua del CIRA (figura 6.1.1). Estos reactores contienen microorganismos que son alimentados y mezclados (tabla 6.1.1), con un efluente sintético que contiene una DQO de 500mg/L (tabla 6.1.2), transformando una parte del sustrato en células y la otra en energía. Con la parte transformada en energía y gases, se da la eliminación directa de una fracción de la masa contaminante ($\cong 60\%$ en condiciones aerobias). La energía producida es utilizada por los microorganismos para la síntesis celular a partir de la segunda fracción de sustrato. Pasando de una forma soluble a una sedimentable (lodo), la remoción de la segunda parte de la materia orgánica se obtiene a través de la sedimentación y purga del lodo formado (tabla 6.1.1). Después la estabilización de los sólidos biológicos sigue con la respiración endógena (muerte de las células) (Fall, 2012).

El agua residual sintética estuvo compuesta solo de sustrato rápidamente biodegradable (S_s) y totalmente soluble. El objetivo de utilizar esta agua fue que el lodo que se desarrolla en el reactor no contuviera fracciones de DQO inerte que proviniera del influente (X_i). Con lo cual se aseguró, que los componentes del lodo modelo sean únicamente biomasa (X_H) y los productos residuales del decaimiento (X_P). La composición del agua sintética se describe en la tabla 6.1.2.



Figura 6.1.1 Imagen del reactor de lodos activados tipo batch de 30L, instalado en el Laboratorio de Calidad del Agua del CIRA.

El tiempo de retención celular (Θ_c) para los dos reactores fue de 15 días, por lo que se purgan diariamente 2L de licor mezclado mientras se está aireando de un total de 30L por cada reactor ($Q_w = Vol / \Theta_c$). La sedimentación se llevó a cabo después de apagar la aireación para que se deje de mezclar el licor y los sólidos de peso específico superior al del líquido puedan asentarse, en esta etapa la actividad de los microorganismos decreció.

Tabla 6.1.1. Duración de las etapas del ciclo de mantenimiento de los reactores de lodos activados

Etapa	Duración
Alimentación	1 minuto
Mezcla sin aire	1 hora
Mezcla con aire	22 horas
Purga del licor	1 minuto (se hizo manualmente)
Sedimentación	1 hora
Total	24 horas

Tabla 6.1.2. Agua concentrada del efluente sintético

Componentes mayores			Componentes menores (trazas)		
Nombre	Composición	mg/L	Nombre	Composición	mg/L
Acetato Sódico	CH ₃ COONa (500 mg/L DQO)	641	Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	0.045
Cloruro de Amonio	NH ₄ Cl (28 mg N /L)	107	Sulfato de Zinc Hepta-hidratado	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0.036
Fosfato de Potasio Monobásico	KH ₂ PO ₄ (2.7 mg P /L)	12	Cloruro de Manganeso Tetra-hidratado	MnCl ₂ ×4H ₂ O	0.036
Cloruro de Potasio	KCl	36	Sulfato Cúprico Penta-hidratado	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.009
Cloruro de Hierro Hepta-hidratado	FeCl ₃ ×6H ₂ O	5	Yoduro de Potasio	KI	0.054
Sulfato de Magnesio Hepta-hidratado	MgSO ₄ ×7H ₂ O	90	Molibdato de Sodio Bi-hidratado	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0.018
Cloruro de calcio Bi-hidratado	CaCl ₂ ×2H ₂ O	14	Cloruro de Cobalto Hexa-hidratado	CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.045
Extracto de levadura		1	* solución de elementos traza 600 mL		
EDTA		1			

Para llevar el monitoreo de los reactores, se realizaron semanalmente diferentes análisis de medición de lodos, como lo son: demanda química de oxígeno (DQO_{total} y DQO_{soluble}), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), índice de la DQO particulada

(IQV), índice volátil total (IVT), índice volumétrico del lodo (IVL), velocidad de sedimentación, respirometría y diámetro de la partícula. También diariamente se tomó la temperatura, conductividad y pH de cada reactor.

A continuación se detalla un poco más los métodos de medición de velocidad de sedimentación y tamaño de las partículas.

6.1.1. Prueba de sedimentación

Para la prueba de sedimentación, se colocó un 1litro de licor mezclado en una probeta graduada de un 1L, y luego se comenzó a medir la altura de la interfase entre la fase líquida y la sólida, a diferentes tiempos. A partir de esta prueba se obtuvo una gráfica de la variación de la altura de la interfase en metros (eje y) en función del tiempo en horas (eje x). Para calcular la velocidad de sedimentación se tomaron los puntos que siguen una recta (asentamiento libre), ya que los datos que le siguen reflejan un asentamiento impedido y posteriormente la compresión de los lodos. A los datos seleccionados, se les sacó la pendiente, donde el valor de **a** en la ecuación lineal **ax+b** fue igual a la velocidad de sedimentación en m/h.

6.1.2. Análisis de diámetro de la partícula

Inicialmente se determinó el diámetro de las partículas en el licor de los dos reactores desde que se observaron flocos granulares en los sedimentos. Se utilizó el equipo de diámetro de la partícula de la marca COULTER, modelo LS100Q, el cual mide el diámetro de las partículas presentes en una solución.

Antes de usar el equipo se calibró con agua destilada y antes de hacer las lecturas se alineó el láser con un ciclo que se programa en el software del aparato, después se llenó con agua destilada más el licor (de 1 a 3 mL de licor) el depósito del equipo. Para hacer las corridas, se programó un nuevo ciclo en el software.

Las lecturas se realizaron por triplicado para que los resultados fueran representativos, se calculó el promedio para hacer una sola curva, posteriormente se obtuvieron los valores de la media, mediana, moda y desviación estándar de las réplicas de cada corrida.

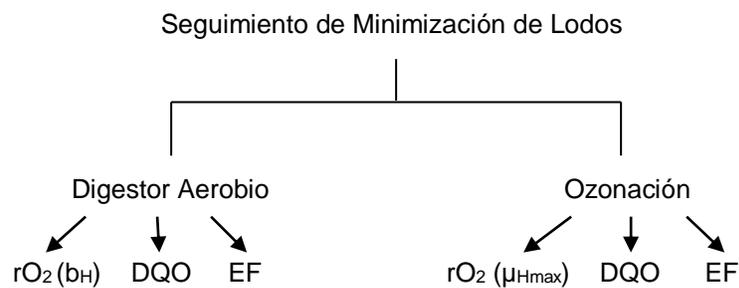
6.1.3. Observación de los flocs en el lodo activado por microscopía de fluorescencia

El protocolo utilizado para preparar las muestras fue el descrito en el Kit VIVO/MUERTO de **®BacLight™**. Se tomaron 5 mL de licor del reactor A y se prepararon como en la muestra 3 de Citometría de Flujo (tinción con SYTO 9 y Yoduro de propidio), la preparación se puso en un porta-

objetos, posteriormente se le colocó el cubre-objetos y se dejó secar durante 10 minutos. La muestra fue observada en un microscopio focal con barrido laser que se encuentra en el CCIQS-UAEMex-UNAM. Esta preparación fue excitada de los 500 y 700 nm para poder observar su fluorescencia.

6.2. Etapa II: Seguimiento de la minimización de lodos

Se hicieron dos procesos de minimización de lodo, una digestión aerobia y tratamientos con ozono. El siguiente diagrama muestra las variables y estrategias del estudio en particular, con relación a las muestras a analizar por tasa de consumo de oxígeno (rO_2), DQO y espectrofluorometría (EF).



- Temperatura del digestor: temperatura ambiente (20°C)
- Principales parámetros a medir: citometría de flujo, espectrofluorometría y tasa de consumo de oxígeno (rO_2)
- Otros parámetros: DQO_{total}, DQO_{soluble}, pH y nitratos (NO_3^-).
- Periodos de muestreo: en la tabla 6.2.1 se muestra la frecuencia con la que se realizaron las mediciones de los diferentes parámetros respecto al tiempo en el digestor aerobio.

Tabla 6.2.1. Frecuencia de mediciones de los parámetros en el digestor aerobio respecto al tiempo.

Día	DQO _{total}	DQO _{soluble}	rO_2 (b _H)	EF	pH	CMF	NO_3^-
0	X	X		X	X	X	
1			X	X			
2	X	X	X	X	X		
3			X	X	X		
4	X	X	X				
5							
6							
7	X	X	X	X	X		
8							

“Evaluación de procesos de baja producción de lodo por técnicas de medición de fluorescencia”

Día	DQO _{total}	DQO _{soluble}	rO ₂ (b _H)	EF	pH	CMF	NO ₃ ⁻
9							
10	X	X	X	X	X		
11							
12							
13	X	X	X	X	X		
14							
15							
16							
17			X	X	X		X
18							
19							
20							
21	X	X	X	X	X		
22			X				
23							
24			X		X		
25							
26							
27							
28							
29							
30	X	X			X		X
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37	X	X			X		

6.2.1. Origen del lodo:

- Digestor Aerobio: para la medición de b_H se juntaron las purgas del licor mixto de los reactores A y B de los días 26 y 27 de enero del 2015, dando un total de 8L; se dejaron

sedimentar los sólidos para tener un concentrado de 1.5L (aprox $7,500 \text{ mg/L}_{\text{DQO}} = (1,400 \text{ mg/L}_{\text{DQO}} \times 8\text{L})/1.5\text{L}$). El digester se mantuvo incubado a 20C° y con un ambiente saturado de oxígeno.

- Lodo modelo para los tratamientos con ozono: Para medición de la $r\text{O}_2$ se tomaron 600mL de lodo modelo ($\text{DQO } 3,075 \text{ mg/L}_{\text{DQO}}$) de la Planta Toluca Norte (PTN) + 1,220mL de agua de la llave para diluir la DQO aprox. a $1,000 \text{ mg/L}_{\text{DQO}}$ + 50mL de H_2O residual sintética. La ozonación se llevó a una temperatura de 20C° , con un 50% de nivel de ozono, con un flujo de oxígeno de 2 L/min.

Se hicieron 2 experimentos diferentes para la medición de la $r\text{O}_2$ en el lodo modelo (LM) tratado con ozono.

- Medición de la $r\text{O}_2$ en el LM tratado a 0,1,2, 3, 4 y 5 minutos de ozonación
- Medición de la μ_{Hmax} en el lodo tratado a 0 y 5 minutos de ozonación.

Para el seguimiento de la minimización de lodos en los diferentes tratamientos se determinó la DQO total y la DQO soluble mediante el método HACH. Para la determinación de la DQO soluble, la muestra fue filtrada en filtros de fibra de vidrio (GF/C Whatman) con un tamaño de poro de 1.2 μm .

Para medir la concentración de amonio en el digester aerobio, se utilizó un kit comercial de alto rango (0-30 mg/L N-NO_3) por el método HACH.

6.2.2. Medición de la $r\text{O}_2$ por respirometría

El respirómetro consta de cuatro reactores de un litro donde se llevaron a cabo todos los experimentos (2 repeticiones a la vez). Cada reactor fue equipado con un agitador magnético, y una barra de agitación de una pulgada de largo, dos difusores porosos conectados a una bomba de aire, un equipo de calefacción-refrigeración para controlar la temperatura, así como un medidor digital y su sonda para medir el oxígeno disuelto montados en cada reactor del respirómetro. Los resultados de las mediciones se enviaron a un convertidor analógico digital y de ahí a una computadora, el cual produce un registro automático de las concentraciones de oxígeno disuelto (OD) en función del tiempo y este a su vez manda una señal a las bombas de aire que son controladas automáticamente (encendido/apagado de 3 a 4 mg/L de O_2 (cuando se midió μ_{Hmax})) (figura 6.2.1). Los registros se realizaban con un software instalado, en donde se establece una comunicación directa entre el hardware y el software.



Figura 6.2.1. Respirómetro instalado en el Laboratorio de Calidad del Agua del CIRA.

Los métodos que se utilizaron para determinar la tasa específica de decaimiento de la biomasa heterotrófica (b_H) y la tasa máxima de específica de crecimiento heterótrofo (μ_{Hmax}), fueron los propuestos en el ASM1.

Para establecer el respirógrama de una muestra (lodo con o sin alimento) el sistema incrementa el O_2 en el agua y luego corta la fuente, lo que hace que el oxígeno decrezca por efecto de consumo por las bacterias. La pendiente del descenso de la concentración de O_2 en el tiempo representa la tasa de consumo de oxígeno (rO_2 en mg/L.h.). Cada ciclo ON/OFF de la aireación produce un valor de rO_2 .

6.2.2.1. Procedimiento para la medición de la tasa de consumo de O_2 en el digester aerobio

El método usado para determinar el b_H se basó en el procedimiento de Ekama et al. (1986). Se realizaron las mediciones de rO_2 en los días de muestreo que se presentan en la tabla 6.3. Primero se tomó de la incubadora (20°C) el digester y se midió el volumen del lodo, antes y después del experimento para ver cuánto volumen de agua se había evaporado, y completando a este al nivel para no alterar la concentración de sólidos que se estaba digiriendo. Se mezcló el licor antes de transferirlo al respirómetro para medir la rO_2 en cada día.

Para esto, se llevaron una serie de pasos complementarios:

1. Encender el equipo de respirometría.
2. Calibrar los medidores de oxígeno para las condiciones atmosféricas de la ciudad de Toluca (72 % de saturación de oxígeno).
3. En esta prueba se utilizaron botellas de DBO (reactor YS1 y YS2) en duplicado, las cuales se colocaron en un baño (Neslab RTE 7, Termo Electrón Corporation) dentro de un vaso

de 1L con 400 mL aprox. de agua a 20°C para mantener la temperatura del agua de recirculación.

4. Se vertieron aproximadamente 300 mL de la muestra de lodo mezclado saturado de oxígeno, junto con una barra magnética dentro de cada botella de DBO, en las que se insertó una sonda de oxígeno para medir el rO_2 del día en cuestión.

Con los datos obtenidos, se graficó el logaritmo natural de rO_2 ($\ln rO_2$) en función del tiempo (t). La pendiente de la curva de rO_2 es el coeficiente de decaimiento clásico $b'H$ (respiración endógena), del que se puede deducir el valor de la constante b_H para el modelo ASM1 (cuando es por muerte-regeneración).

Finalmente el b_H (muerte-regeneración) se obtiene con la siguiente expresión:

$$b_H = \frac{b'H}{1-Y(1-f'p)}$$

Donde:

b_H es el coeficiente de decaimiento por muerte-regeneración (ASM1)

$b'H$ es el coeficiente de decaimiento por respiración endógena.

Y es el rendimiento de la biomasa heterotrófica.

$f'p$ es la fracción de biomasa transformada en materia particulada durante el decaimiento (0.2 por consenso).

El coeficiente de decaimiento heterotrófico b_H (constante de orden 1) se determinó para una temperatura de 20°C.

6.2.2.2. Procedimiento para la medición de la tasa de consumo de O_2 en las muestras de lodo tratado con ozono

Para estas mediciones se usó el método de Kappeler y Gujer (1992), donde establece que para determinar la tasa máxima específica de crecimiento heterótrofo ($\mu_{H_{max}}$), se debe realizar una prueba respirométrica (rO_2) en un sistema batch, con agua residual en la cual se inocula biomasa con una relación alta S/M (sustrato/biomasa). Entonces se graficará el logaritmo natural de rO_2 ($\ln rO_2$) en función del tiempo (t). La ecuación de la curva estará dada por la siguiente ecuación:

$$\ln \left\{ \frac{rO_2 t}{rO_2 (t_0)} \right\} = (\mu_{H_{max}} - b'H) * t$$

Dónde: conociendo el valor de b_H , μ_{Hmax} se obtendrá de la pendiente de la curva la cual es ($\mu_{Hmax} - b'H$).

$rO_2(t)$ tasa de consumo de oxígeno en el tiempo t .

$rO_2(t_0)$ tasa de consumo de oxígeno en el tiempo 0.

$b'H$ constante de decaimiento (respiración endógena $d-1$)

μ_{Hmax} tasa específica máxima de crecimiento heterótrofo

Alternativamente, en lugar de utilizar la ecuación lineal, se puede escribir la ecuación equivalente:

$$rO_2 = rO_2(t_0) * e^{(\mu_{Hmax} - b'H) * t}$$

Es de la forma ($y=ae^{bt}$) donde a y b pueden obtenerse con hacer la regresión exponencial, y luego μ_{Hmax} se obtiene del valor de b obtenido. Este segundo método fue utilizado en esta investigación.

Como se mencionó anteriormente, se hicieron dos experimentos diferentes para la medición de la rO_2 en el lodo modelo (LM) de la PTN tratado con ozono, a diferentes dosis (0, 1, 3 y 5 minutos de ozonación). La serie de pasos que se siguieron son los siguientes:

1. Se enciende el equipo de respirometría.
2. Se calibran los medidores de O_2 a 72 % de saturación de oxígeno
3. Se toma aproximadamente 650mL de LM para cada tratamiento de ozonación (0, 1, 3 y 5 minutos), a una temperatura de 20°C, con un 50% de nivel de ozono y con un flujo de oxígeno de 2 L/min.
4. Se coloca en cada reactor 300 mL de cada tratamiento + 300 mL de agua de llave a una temperatura de 20°C. Para poder calcular la pendiente se utilizó un software propio.
5. Se grafica observando una curva creciente de consumo de oxígeno. Por lo anterior el volumen de lodo utilizado para la siembra de cada reactor debe ser muy bajo (lodo tratado con ozono)
6. Se pone en funcionamiento la prueba y al tiempo cero se inyecta en el reactor 50 mL de agua residual sintética.
7. Las bombas de aireación son controladas por la computadora (encendido / apagado de 3 a 5 mg/L O_2).
8. Los datos obtenidos durante el estudio son mandados a la computadora que controla el respirómetro por medio del software de control y adquisición de datos (windmill).

Para la medición de μ_{Hmax} a partir de la curva de crecimiento respecto al tiempo en el lodo tratado a 0 y 5 minutos de ozonación, se siguió el procedimiento descrito anteriormente a diferencia de que

este se monitoreo 18 horas (20:54 a las 13:30). De manera paralela se midió el crecimiento por espectrofluorometría.

6.2.3. Medición de las poblaciones de bacterias vivas y muertas por citometría de flujo

6.2.3.1. Preparación de las muestras control

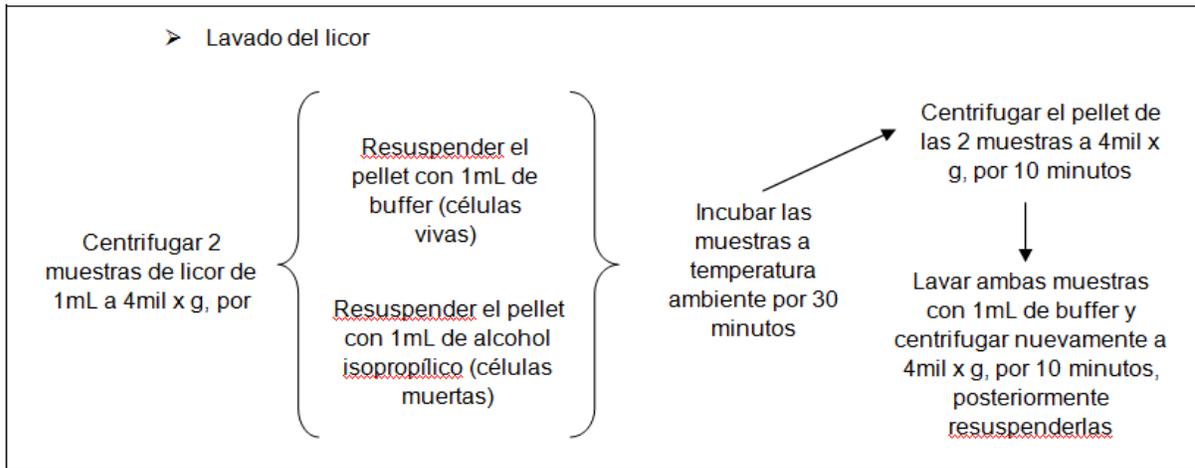


Figura 6.2.3. Metodología para el lavado del licor.

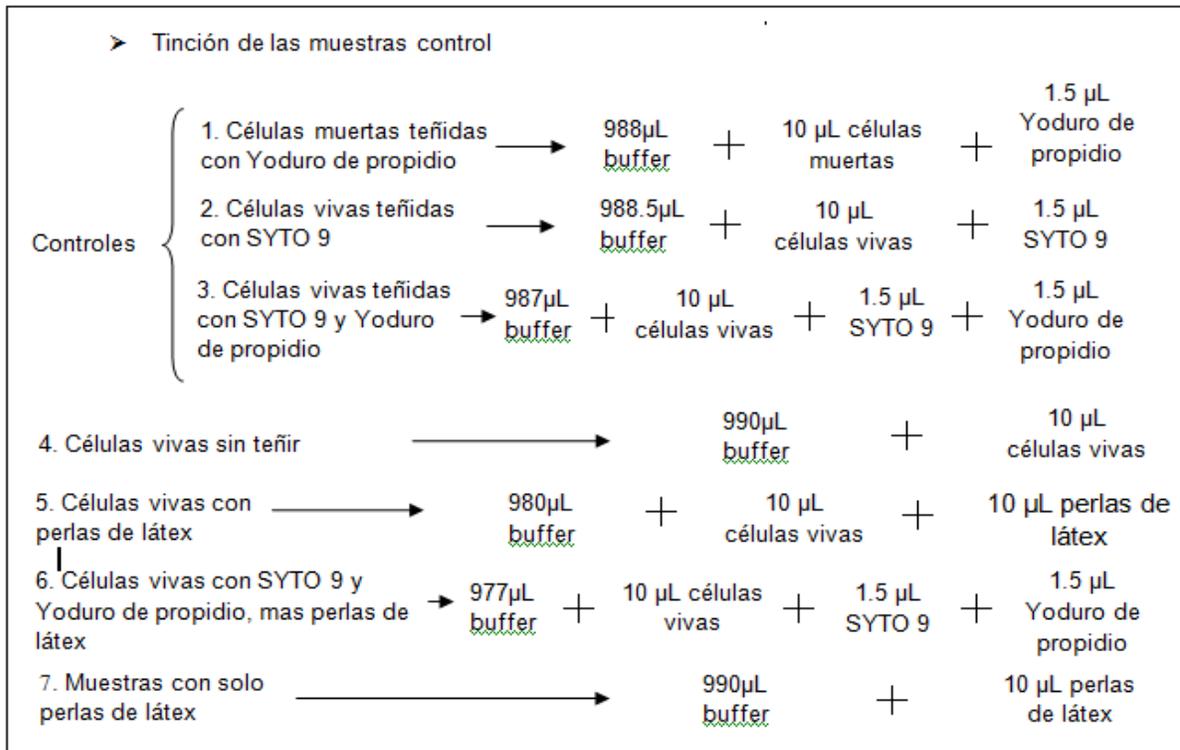


Figura 6.2.4. Metodología para la tinción de las muestras control.

Las muestras se analizaron con un citómetro de la marca FACS Calibur de BD, disponible en la Facultad de Veterinaria de la UAEMex.

6.2.4. Procedimiento para las mediciones del porcentaje de bacterias vivas y muertas por espectroscopía de fluorescencia

Todos los espectros de fluorescencia fueron realizados en un espectrofluorómetro (Modelo LS-55, Perkin Elemer, EUA) equipado con una lámpara de xenón de 150 watts como fuente de excitación. El espectrofluorómetro fue controlado con un software WINLAB (Perkin Elemer, EUA, 2000), operado desde una computadora de escritorio (Hewlett Packert, Compac de 7900, 2009)

a) Preparación de muestras para la curva de calibración:

- Lavado del licor

Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon cinco mezclas con diferentes proporciones de suspensiones bacterianas vivas y muertas.

1. Centrifugar 2 muestras de licor de 5 mL a 4 mil x g (revoluciones por minuto), por 10 minutos.
2. Resuspender el pellet de una de las muestras con 5 mL de buffer (células vivas) y la otra muestra con 5mL de alcohol isopropilico (células muertas). Incubar ambas muestras a temperatura ambiente por 30 minutos.
3. Centrifugar el pellet de las 2 muestras a 4 mil x g, por 10 minutos, lavar ambas muestras con 5 mL de buffer y centrifugar nuevamente a 4 mil x g, por 10 minutos, posteriormente resuspenderlas de nuevo en 5 mL de buffer.

- Preparación de los diferentes estándares:

- 1) 0 μ L Células vivas + 1000 μ L Células muertas (0% vivas, 100% muertas)
- 2) 250 μ L Células vivas + 750 μ L Células muertas (25% vivas, 75% muertas)
- 3) 500 μ L Células vivas + 500 μ L Células muertas (50% vivas, 50% muertas)
- 4) 750 μ L Células vivas + 250 μ L Células muertas (75% vivas, 25% muertas)
- 5) 1000 μ L Células vivas + 0 μ L Células muertas (100% vivas, 0% muertas)

Las tinciones se hicieron con el Kit VIVO/MUERTO de ®BacLight™, que contiene los fluoró cromos SYTO 9 que tiñe todas las bacterias y Yoduro de propidio que solo tiñe bacterias muertas. (BacLight, 2004). Este Kit fue el mismo que se usó para teñir las muestras de citometría y microscopía.

Para la tinción, las mezclas de los estándares fueron diluidas de la siguiente forma: 987 µL de Buffer + 1.5 µL de SYTO 9 + 1.5 µL de Yoduro de Propidio + 10 µL de estándar = 1000 µL o 1 mL de muestra. Las muestras teñidas quedan al final con un factor de dilución de 1:3 (1 mL de muestra + 2 mL de Buffer). Cada muestra se hizo por duplicado y se colocó en una celda de cuarzo de 3 mL para poder leer su intensidad de fluorescencia.

6.2.4.1. Curva de calibración

Se midió el espectro de emisión de fluorescencia (excitación 470 nm, emisión 490 a 700 nm) de cada suspensión de células y se les sustrajo el blanco de agua desionizada. Los archivos con las mediciones se exportaron de WINLAB a hojas de cálculo en Excel, en donde se les resto a los espectros el agua destilada para eliminar perturbaciones Rayleigh y Raman, se graficaron las longitudes de onda de cada suspensión, posteriormente se calculó la relación de la intensidad integrada de cada espectro entre 510-540 nm (em1; verde) y 620-650 (em2; rojo) para cada suspensión bacteriana con la siguiente ecuación:

$$\text{Intensidad } em1/em2 = \frac{\text{Suspensión de células, em1 (vivas)}}{\text{Suspensión de células, em2 (muertas)}}$$

*Intensidad em1/em2 (Relación de integración de la fluorescencia em1 y em2)

6.2.5. Modelado y estimación de parámetros (b_H)

La modelación dinámica permite predecir la calidad del efluente, la demanda de oxígeno y la producción del lodo en respuesta a las fluctuaciones en tiempo real de la carga y del caudal del influente. Los modelos son una descripción matemática que se expresa a través de balances de masas que toman en cuenta la cinética de reacción de los procesos. Los componentes y los procesos involucrados en la modelación se encuentran de forma simplificada en la matriz de la tabla 6.2.2.

El ASM1 se usó para modelar el lodo digerido, la matriz del modelo se muestra en la tabla 6.2.2. A pesar de que la biomasa autótrofa fue ignorada como un componente del lodo (ya que es pequeña respecto a la DQO total), en términos de rO_2 , la nitrificación tiene que ser tomada en cuenta ya que

el amonio liberado por la lisis de las bacterias heterótrofas ($fN = 0.063 \text{ mg N por mg DQO de } X_H$) aumenta la rO_2 durante la digestión, que se considera cuando se define la constante de decaimiento con nitrificación ($C = 1 + 4.57 * fN$). Es importante destacar que la inclusión del proceso de nitrificación no afecta a las estimaciones de b_H (Wentzel et al, 1989b; Van Haandel et al., 1998); sólo modifica la estimación de la cantidad de biomasa activa inicial (X_{Hini}).

Tabla 6.2.2. Matriz con la representación del proceso decaimiento en el modelo ASM1

Proceso	So	XP	XH	Tasa
Decaimiento con Nitrificación	$-1(1-fp)*C$	fp	-1	$b_H.X_H$

Donde:

fp fracción de biomasa que se transforma en productos inertes

C contante estequiométrico ($C = 1 + 4.57 * fN$)

La modelación, estimación de parámetros y la sensibilidad se realizaron utilizando AQUASIM. Los parámetros estimados fueron $X_H \text{ ini}$, $XP \text{ ini}$ y b_H , que representan la biomasa heterótrofa inicial, los residuos endógenos al inicio (mg/L_{DQO}), respectivamente, y la constante cinética de decaimiento (d^{-1}).

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. Etapa I: Cultivo de lodo modelo y monitoreo de reactores

Se hicieron los análisis de la purga normalmente de una a tres veces por semana, para mantener de forma constante la concentración de sólidos en el sistema.

A finales de septiembre del 2013 los reactores sedimentaban muy poco debido al fenómeno de esponjamiento, ya que las bacterias filamentosas impedían la interacción entre flocs, por lo que casi no decantaban. En la corrida del 25 de septiembre del 2013 la velocidad de decantación fue menor a 1 m/h, observándose un lodo muy esponjoso.

Debido a la falta de sedimentación se cambió la forma de alimentación, dejando mezclar con los 2L de alimento durante una hora únicamente los sólidos decantados, teniendo una DQO concentrada para que todas las bacterias tuvieran más alcance al alimento. Anteriormente se mezclaban normalmente 10 L de sedimentos con 2 L de alimento diluido en 18 L, para que en el reactor nos diera un total de 30 L y la DQO en ese momento no fuera muy concentrada.

7.1.1. pH, temperatura, conductividad eléctrica y turbidez

En la tabla 7.1.1 se muestran los valores promedio de pH, temperatura, conductividad eléctrica y turbiedad de enero a mayo del 2014. Los valores tomados en el 2013 no se reportaron debido al fenómeno de esponjamiento. Estas características fisicoquímicas fueron valoradas semanalmente en el periodo de monitoreo.

Tabla 7.1.1 Valores promedio, desviación estándar (DE), máximos y mínimos del pH, temperatura, conductividad y turbidez en el reactor A y B de enero a mayo del 2014.

	pH		Temperatura (°C)		Conductividad (µs/cm)		Turbiedad (UTN)	
	RA	RB	RA	RB	RA	RB	RA	RB
Promedio	8.9	8.7	21.9	21.4	1579	1311	2.78	2.74
DE	0.19	0.29	2.89	2.36	8.49	56.89	0.8	0.83
Máximos	9.11	9.08	28.5	26.5	1585	1411	3.67	3.77
Mínimos	8.6	8.23	16	15	1573	1281	2.11	1.97

Los valores altos de pH en los dos reactores fueron muy semejantes, los cuales están relacionados con el pH del agua potable (de 8 a 8.5) con la que se prepara el agua residual sintética. El pH obtenido en los lodos estuvo fuera del intervalo óptimo (6.5 – 8.5), pero no se notaron efectos

adversos evidentes. En el caso del lodo de estudio, se decidió en ese momento no corregir el pH del cultivo por 4 razones:

- 1) El objetivo primordial fue producir un lodo con el cual se trabajará en experimentos de ozonación y en otras evaluaciones (b_H , espectroscopia de fluorescencia, etcétera.)
- 2) El pH alto no afectó el desempeño, ya que el efluente siempre tuvo un DQO bajo, y no hubo interés hacia los otros parámetros como la posible remoción de fósforo.
- 3) La corrección de pH hubiera sido muy costosa para los dos reactores de 30 L.
- 4) El agua de llave (pH 8-8.5) y la composición del alimento contribuyeron al pH final. El potencial de hidrógeno es una característica propia al tipo de cultivo que se tiene (bacterias acumuladoras de fósforo y/o glicógeno PAO y GAO). Wentzel et al. (1989a) reportó un pH de 7.1 durante la fase anaerobia, el cual sube a más de 9 durante la fase aerobia si no es controlado con ácido.

Los valores de conductividad eléctrica fueron más altos que los del agua potable (489 $\mu\text{s}/\text{cm}$), debido a los productos químicos añadidos en el alimento. Los rangos de conductividad no fueron atípicos de las aguas residuales.

La Turbidez en los efluentes de los reactores en general fue muy baja, siendo buen el proceso de sedimentación.

7.1.2. Sólidos y relación IVT (SSV/SST)

En las tablas 7.1.2 y 7.1.3 se pueden observar los valores promedio de los sólidos y del IVT, los cuales fueron medidos una vez por semana, fueron determinados con base en los métodos estándares (Standard Methods 2540D y SM 2540E) para sólidos y para IVT en el Metcalf y Eddy (2004).

Tabla 7.1.2. Valores promedio, desviación estándar (DE), máximos y mínimos de los SST, SSV e IVT, en los reactores A y B del mes de agosto y septiembre del 2013.

	REACTOR A			REACTOR B		
	SST	SSV	IVT	SST	SSV	IVT
	(mg/L)					
Promedio	1905	1681	0.882	1944	1721	0.885
DE	291	266	0.02	274	248	0.02
Máximos	2417	2147	0.91	2457	2197	0.91
Mínimos	1535	1360	0.86	1500	1330	0.85

Tabla 7.1.3. Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de los SST, SSV e IVT, en los reactores A y B en el 2014.

	REACTOR A			REACTOR B		
	SST	SSV	IVT	SST	SSV	IVT
	(mg/L)					
Promedio	1393	1205	0.87	1405	1204	0.86
DE	84	111	0.04	119	123	0.06
Máximos	1510	1400	0.93	1513	1380	0.92
Mínimos	1280	1120	0.83	1240	1093	0.78

El IVT se obtiene con dividir los sólidos suspendidos volátiles (SSV) entre los sólidos suspendidos totales (SST).

En los resultados de la tabla 7.1.2 y 7.1.3 se observó una pérdida gradual de sólidos en el reactor A y B lo cual fue reflejado en los valores decrecientes de SST y SSV. En la tabla 7.1.2 el promedio de los SST fue de 1905 mg/L en el reactor A y 1944 mg/L en el B, mostrando que todavía no se había alcanzado el equilibrio ya que no mantuvieron una concentración constante. A finales del mes de septiembre del 2013 los reactores empezaron a perder más sólidos debido a un problema de bacterias filamentosas. En la tabla 7.1.3 el reactor A tuvo un promedio de SST de 1393 mg/L y el B de 1405 mg/L.

El IVT promedio obtenido en los meses de agosto y septiembre del 2013 estuvo alrededor de 0.9 mg SSV/mg SST (de materia orgánica), y el IVT que se obtuvo a partir del 2014 fue alrededor de 0.86 mg SSV/mg SST. Lo que corresponde a valores esperados para cultivos bacterianos con agua sintética a base de acetato en el Metcalf y Eddy (2004) que es de 8.5 mg SSV/mg SST.

7.1.3. Resultados de DQO y de la relación IQV (DQO/SSV)

La demanda química de oxígeno (DQO) mide la cantidad de materia susceptible a ser oxidada por medio de Dicromato (oxidante fuerte).

El IQV se obtiene de dividir la DQO particulada ($DQO_x = DQO_{total} - DQO_{soluble}$) entre los SSV, fue determinado con base en los metodos del Metcalf y Eddy (2004).

Las tablas 7.1.4 y 7.1.5 muestran los valores promedio de la DQO_{total} , $DQO_{soluble}$, DQO del efluente, DQO_x y del IQV. Estos datos fueron tomados de 1 vez por semana.

Tabla 7.1.4. Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de la DQO y el IQV, en el reactor A y B del mes de agosto y septiembre del 2013.

	REACTOR A				REACTOR B					
	Influyente				Efluente	Influyente				Efluente
	DQO _{total}	DQO _{soluble}	DQO _x	IQV	DQO	DQO _{total}	DQO _{soluble}	DQO _x	IQV	DQO
	(mg/L)			(g)	(mg/L)	(mg/L)			(g)	(mg/L)
Promedio	1919	18	1901	1.18	16	2131	11	2120	1.26	16
DE	400	5	403	0.29	6	327	5	331	0.17	8
Máximos	2387	24	2372	1.48	22	2708	20	2708	1.54	22
Mínimos	1102	11	1080	0.65	10	1811	6	1798	1.03	7

*DQO_x= demanda química de oxígeno de la materia particulada (mg/L).

*IQV= DQO_x/SSV

Tabla 7.1.5. Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de la DQO y el IQV, en los reactores A y B en el 2014.

	REACTOR A				REACTOR B				
	Influyente				Efluente				
	DQO _{total}	DQO _{soluble}	DQO _x	IQV	DQO _{total}	DQO _{soluble}	DQO _x	IQV	DQO
	(mg/L)			(g)	(mg/L)			(g)	(mg/L)
Promedio	1791	38	1753	1.36	1744	39	1705	1.41	36
DE	491	4	489	0.14	240	14	227	0.1	4.24
Máximos	1470	42	2711	1.51	2049	54	1981	1.49	39
Mínimos	275	33	1429	1.23	1400	17	1372	1.31	33

En la tabla 7.1.4 el valor promedio de la DQO_{total} en el licor fue de 1919 mg/L en el reactor A y 2131 mg/L en el B, y la soluble fue de 17.6 mg/L en el A y 11.3 mg/L en el B, teniendo como resultado una IQV promedio de 1.18 para el A y 1.26 para el B. Mientras que en la tabla 7.1.5 la DQO_{total} promedio del licor fue de 1791 mg/L en el reactor A y 1744 mg/L en el B, la soluble en el A fue de 38 mg/L y 39 mg/L en el B, teniendo como resultado una IQV promedio de 1.36 para el A y 1.41 para el B, siendo el valor típico de 1.4 (1mg/L de SSV requiere 1.4 mg/L de O₂ para poder oxidarse) (Metcalf y Eddy, 2004). Lo que nos indica que la oxigenación fue basta para oxidar la materia orgánica presente en los lodos.

Los resultados de la DQO del efluente fueron bajos, lo cual quiere decir que el tratamiento es eficiente. La materia disuelta del agua residual sintética bajó más del 91% de la DQO del afluente a

su salida, que va de 500 mg/L en el influente a 16 mg/L de DQO_{total} en promedio en la tabla 7.1.4 y de 500 mg/L en el influente a 33 mg/L y 44 mg/L de DQO total en la tabla 7.1.5.

7.1.4. Resultados de índice volumétrico de lodos (IVL)

El índice volumétrico de lodos indica el volumen ocupado por cada gramo de lodo (mL/g), fue determinado con base en los métodos estándares del Metcalf y Eddy (2004), este se obtiene de la siguiente manera:

*IVL = Volumen del lodo sedimentado en una probeta de 1 L, después de 30 min (ml/L) dividido por la concentración de SST y multiplicado por 1000 (IVL= Vol. sedim/ (SST x 1000)).

En las tablas 7.1.7 y 7.1.8 se pueden observar los valores promedio del índice volumétrico de lodos. Los resultados fueron comparados con los rangos de IVL sugeridos por Sperling (1999) para calificar la sedimentabilidad (tabla 7.1.6).

Tabla 7.1.6. Rangos de IVL sugeridos por Sperling para valorar la sedimentabilidad.

Sedimentabilidad según Sperling (1999)	
IVL (mL/g)	
Muy buena	0-50
Buena	51-100
Media	101-200
Pobre	201-300
Muy pobre	301-400

Tabla 7.1.7. Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos del volumen sedimentado, los SST y el IVL, en el reactor A y B del mes de agosto y septiembre del 2013.

	REACTOR A				REACTOR B			
	Vol. Sedim. (mL)	SST (g/L)	IVL (mL/g)	Sedimentabilidad (Sperling, 1999)	Vol. Sedim. (mL)	SST (mg/L)	IVL (mL/g)	Sedimentabilidad (Sperling, 1999)
Promedio	219.6	1.89	120	Media	297	1.91	148	Media
DE	39.16	0.31	35		95.5	0.17	41	
Máximos	273	2.42	164		450	2.12	199	
Mínimos	190	1.67	79		210	1.76	102	

Tabla 7.1.8. Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos del volumen sedimentado, los SST y el IVL, en el reactor A y B en el 2014.

	REACTOR A				REACTOR B			
	Vol. Sedim. (mL)	SST (g/L)	IVL (mL/g)	Sedimentabilidad (Sperling, 1999)	Vol. Sedim. (mL)	SST (g/L)	IVL (mL/g)	Sedimentabilidad (Sperling, 1999)
Promedio	607	1.349	453	Muy pobre	403	1.394	286	Pobre
DE	142	0.064	613		214.38	0.14	133	
Máximos	770	1.407	602		720	1.513	476	
Mínimos	510	1.28	375		250	1.24	165	

En la tabla 7.1.7 la sedimentabilidad fue media en el par de meses anteriores al suceso de esponjamiento. En el reactor A el IVL de la tabla 7.1.8 confirma el problema de sedimentación que se tuvo, por lo que se cultivo de nuevo lodo en el, mientras que en el B la sedimentabilidad fue pobre aunque todavía se logró mantener en operación. Los resultados indicaron que el lodo tratado fue de una decantación media a pobre, esto pudo estar relacionado con el tipo de bacterias que predominaron en los lodos cuando se realizaron los análisis.

7.1.5. Pruebas de sedimentación

Aunque las bacterias individualmente son muy ligeras para sedimentar, ellas pueden agruparse para formar flóculos suficientemente pesados para precipitar. La velocidad de sedimentación depende de la edad del lodo, del material atrapado en el flóculo y de la cantidad de organismos filamentosos. Por otra parte, la velocidad con la que precipita el lodo debe ser lenta, para que todo el material sea atrapado en éste (Terrones E., 2009).

Al principio de la sedimentación se observó como las partículas se iban uniendo por efecto de la floculación, a medida que se aglomeraron los sólidos la velocidad de asentamiento iba aumentando y luego se estabilizó. Después de cierto tiempo se empezó a ver una sedimentación de compresión debido al peso que ejercen las capas superiores de lodo sobre las inferiores.

La figura 7.1.1 muestra las gráficas de las últimas pruebas de sedimentación a diferentes fechas en el reactor A y B donde se puede observar la velocidad de sedimentación en la ecuación de la recta.

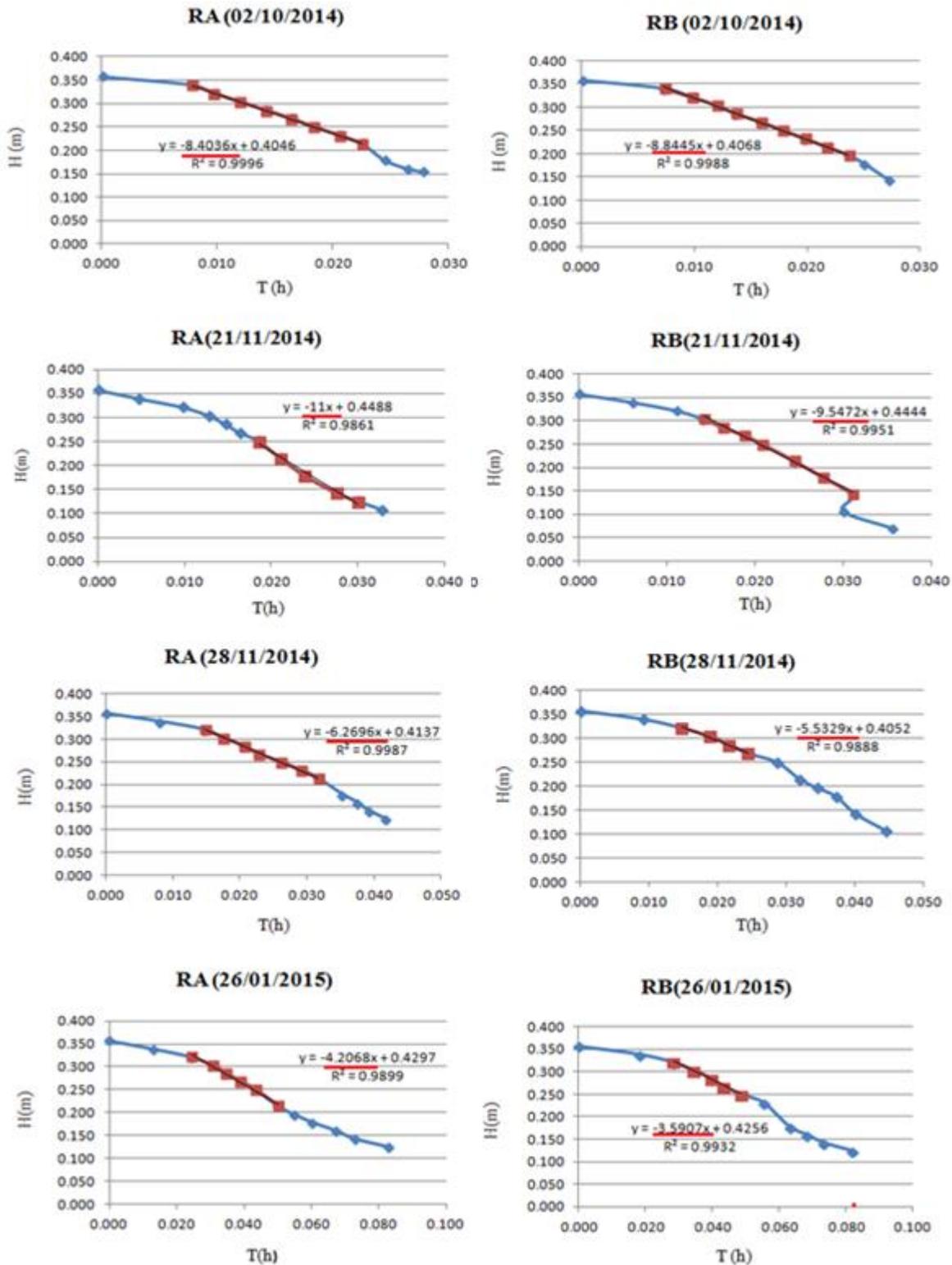


Figura 7.1.1. Graficas de las pruebas de sedimentación en el reactor A y B a principios de octubre del 2014 hasta finales de enero del 2015.

A finales de septiembre del 2013 los reactores sedimentaban muy poco debido al fenómeno de esponjamiento, ya que las filamentosas impedían la interacción entre flocs, por lo que casi no decantaban, se dejaron de monitorear los reactores en lo que se estabilizaban.

En general la velocidad de sedimentación en todas las corridas fue buena con una velocidad de sedimentación promedio entre los 5 y 6 m/h. La prueba de decantación del día 21 de noviembre del 2014 tuvo una velocidad muy alta, de 11 m/h en el reactor A y de 9.54 en el B, observándose un lodo compacto, a diferencia de los bajos valores de decantación del día 26 del enero del 2015 donde velocidad fue de 4.2 m/h en el reactor A y de 3.5 m/h en el B.

7.1.6. Análisis de diámetro de la partícula

Las figuras 7.1.2 y 7.1.3 muestran en forma de histogramas la distribución de tamaños de partículas de los reactores A y B a diferentes fechas. La línea central indica la tendencia (Moda). Además en las tablas 7.1.8 y 7.1.9 se pueden observar los valores promedio la media, mediana, moda y desviación estándar en los reactores.

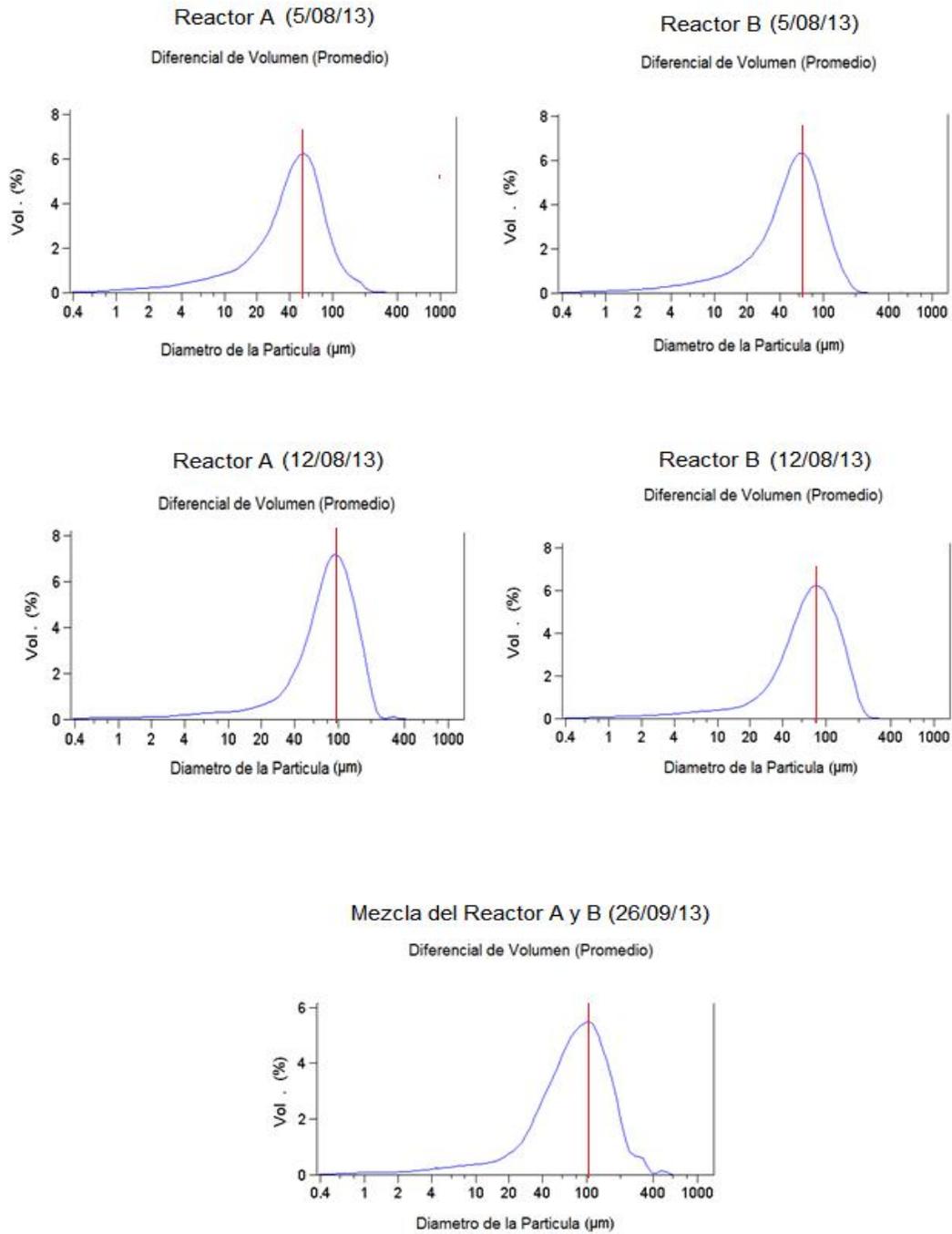


Figura 7.1.2. Histogramas del diferencial de volumen promedio en el reactor A y B, a diferentes fechas del año 2013.

“Evaluación de procesos de baja producción de lodo por técnicas de medición de fluorescencia”

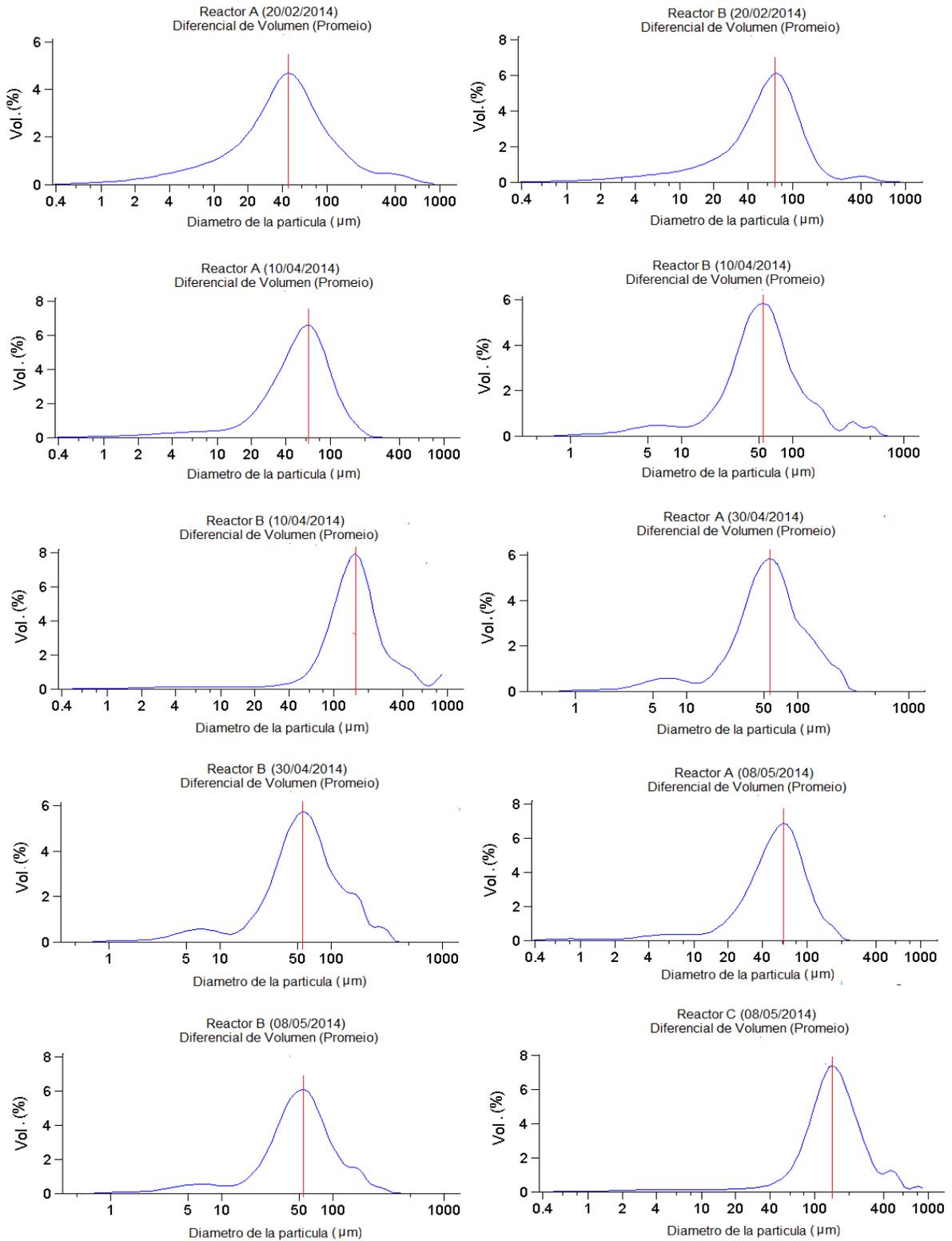


Figura 7.1.3. Histogramas del diferencial de volumen promedio en el reactor A y B a diferentes fechas del 2014.

Tabla 7.1.9. Valores promedio de la media, mediana, moda y desviación estándar de los diámetros de la partícula, en los reactores A y B a diferentes fechas del año 2013.

	05/08/2013		12/08/2013	
	Reactor A	Reactor B	Reactor A	Reactor B
	µm			
Media	36.73	43.8	69.11	60.52
Mediana	44.7	53.52	83.7	72.63
Moda	55.13	60.52	96.49	80.07
DE	2.49	2.44	2.37	2.43

Tabla 7.1.10. Valores promedio de la media, mediana, moda y desviación estándar de los diámetros de la partícula, en los reactores A y B a diferentes fechas del año 2014.

	20/02/2014		10/04/2014		30/04/2014		08/05/2014	
	RA	RB	RA	RB	RA	RB	RA	RB
	µm							
Media	39	50	47	50	51	52	47	46
Mediana	43	60	55	53	55	57	54	51
Moda	46	73	61	55	55	55	61	55
DE	3	3	2	3	2	2	2	2

Los resultados de las tablas 7.1.9 y 7.1.10 reflejan un aumento en el tamaño de los flóculos en el transcurso de las mediciones.

Los resultados de la tabla 7.1.9 reflejan un aumento en el tamaño de los flocs, observado una media que vario de 36 µm a 68 µm en el reactor A y de 43 µm a 60 µm en el B. La tabla 7.1.10 nos mostró que hubo un aumento en el tamaño de los flocs en el transcurso de las mediciones, que fue de 39 µm a 51 µm en el reactor A y de 50 µm a 52 µm en el B, a excepción del día 8 de mayo del 2014 que disminuyeron su tamaño. Esto se debe a que los reactores conforme se van estabilizando van aumentando el tamaño de sus flóculos.

Los datos de las tablas anteriores evidencian que la sedimentación está relacionada con el tamaño de los flóculos, teniendo más superficie de contacto entre ellos cuando aumentan su tamaño, por lo que van sedimentando más rápido mientras se van uniendo.

7.1.7. Imágenes de los flocs en el lodo activado por microscopía de fluorescencia

En la figura 7.1.4 se observa la estructura de los flocs y su tamaño, donde se logra distinguir que las bacterias que predominan en el lodo presentan formas esféricas y se encuentran de forma ramificada, formando flóculos redondos en general.

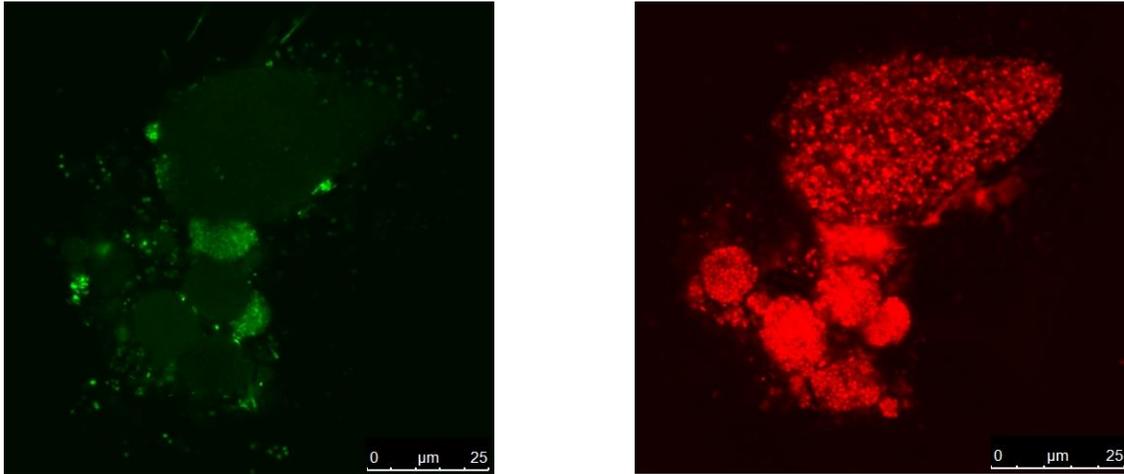


Figura 7.1.4. Imágenes de microscopía de fluorescencia de una muestra de licor del reactor A teñido con SYTO 9 y Yoduro de propidio.

7.2. Etapa II: Seguimiento de la minimización de lodos

7.2.1. Seguimiento del digestor aerobio por rO_2 y DQO en AQUASIM, y por espectroscopía de fluorescencia

7.2.1.1. Mediciones de la DQO, pH y nitratos en la digestión aerobia

Los resultados de los análisis de la DQO para el seguimiento de la minimización de lodos en el digestor aerobio se muestran en la tabla 7.2.1.

Tabla 7.2.1. Valores de DQO del digestor aerobio respecto al tiempo.

Fecha	Día	DQO total					DQO soluble					DQOx
		replica 1	replica 2	promedio	DE	C.V.	replica 1	replica 2	promedio	DE	C.V.	
27/01/2015	0	7280	6760	7020	368	5.2	36	-----	36	----	----	6984
29/01/2015	2	5856	6144	6000	204	0.2	83	-----	83	----	----	5917
31/01/2015	4	6008	5960	5984	33.9	0.6	45	42	43.5	2.1	4.9	5941
03/02/2015	7	5128	5144	5136	11.3	0.2	63	65	64	1.4	2.2	5072
06/02/2015	10	4640	4816	4728	125	2.6	114	110	112	2.8	2.5	4616
09/02/2105	13	4416	4488	4452	50.9	1.1	169	156	162.5	9.2	5.7	4290
17/02/2015	21	3888	3864	3876	17	0.4	184	-----	184			3692
26/02/2015	30	3544	3504	3524	28.3	0.8	216	212	214	2.8	1.3	3310
05/03/2015	37	3352	3312	3332	28.3	0.8	200	260	230	42.4	18.4	3102

En la tabla 7.2.1 se observó una disminución de la DQO total respecto al tiempo, mientras que la DQO soluble fue aumentando conforme iban pasando los días de digestión, esto se debe a la lisis de las bacterias que están muriendo en la degradación del lodo y van liberando sus productos solubles. Se obtuvo el valor de la DQOx ($DQO_{particulada} = DQO_{total} - DQO_{soluble}$) para poder hacer la modelación, el análisis de sensibilidad y la estimación de parámetros en AQUASIM.

En la tabla 7.2.2 se muestran los valores de las mediciones de pH y nitratos en la digestión aerobia, donde se puede observar que ocurrió el fenómeno de nitrificación por el alto valor en los resultados de NO_3^- que también tuvieron un ligero aumento del día 17 al día 30 del monitoreo de la digestión.

Tabla 7.2.2. Valores de pH y Nitratos del digestor aerobio respecto al tiempo.

Fecha	Día	pH	Nitratos mg/L $N-NO_3^-$
27/01/2015	0	8.84	-----
29/01/2015	2	8.54	-----
03/02/2015	7	6.75	-----
06/02/2015	10	6.22	-----
09/02/2105	13	5.66	-----
13/02/2015	17	6.24	203
17/02/2015	21	6.17	-----
26/02/2015	30	6.19	216
05/03/2015	37	6.72	-----

7.2.1.2. Mediciones de la rO_2 de la digestión aerobia por respirometría para el cálculo de la constante cinética b_H

Las pruebas respirométricas para determinar el coeficiente de decaimiento o muerte se realizaron de acuerdo al procedimiento recomendado. Cada día de medición de la rO_2 la muestra fue medida por duplicado, las condiciones de temperatura y aireación se mantuvieron constantes durante el monitoreo de la digestión.

En la tabla 7.2.3 se muestran las mediciones de la rO_2 del digester aerobio por duplicado (reactor YS1 y YS2).

Tabla 7.2.3. Mediciones de consumo de oxígeno del digester aerobio en el reactor YS1 y YS2.

Fecha y hora	Medición	t (días)	MEDICIÓN YS1			MEDICIÓN YS2		
			por hora	por día	mg/L.d	por hora	por día	mg/L.d
			rO_2 (mg/L.h)	rO_2 (mg/L.d)	Ln (rO_2)	rO_2 (mg/L.h)	rO_2 (mg/L.d)	Ln (rO_2)
27/01/2015 -10:14	1	0.00	20.32	487.68	6.19	20.67	496.08	6.207
28/01/2015 -10:52	2	1.03	19.07	457.68	6.126	17.94	430.56	6.065
29/01/2015 -11:32	3	2.05	16.93	406.32	6.007	16.57	397.68	5.986
30/01/2015 11:32	4	3.05	17.05	409.2	6.014	15.32	367.68	5.907
31/01/2015 -08:47	5	3.94	13.75	330	5.799	14.23	341.52	5.833
03/02/2015 -11:14	6	7.04	10.63	255.12	5.542	11.14	267.36	5.589
06/02/2015- 12:09	7	10.08	9.71	233.04	5.451	10.15	243.6	5.496
09/02/2015- 11:31	8	13.05	5.12	122.88	4.811	5.35	128.4	4.855
13/02/2015-11:45	9	17.06	4.06	97.44	4.579	4.18	100.32	4.608
17/02/2015 -10:11	10	21.00	3.54	84.96	4.442	3.7	88.8	4.486
20/02/2015 -11:17	11	24.04	2.46	59.04	4.078	2.69	64.56	4.168

En la figura 7.2.1 se muestra el resultado de la tasa de consumo de oxígeno en la prueba de b_H por duplicado realizada a 20°C en función del tiempo. En general las mediciones de rO_2 por duplicado fueron concordantes.

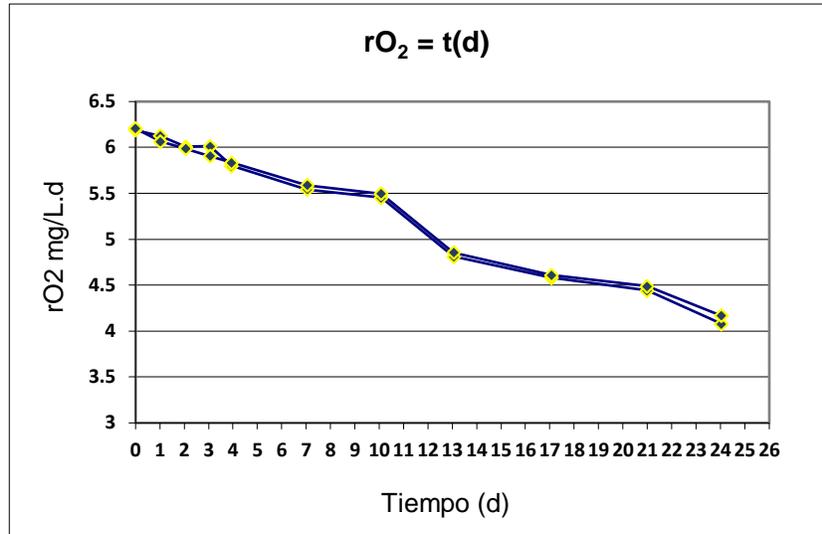


Figura 7.2.1. Tasa de consumo de oxígeno del digestor aerobio respecto al tiempo en días.

Como fue explicado en el apartado de la metodología una manera de estimar el b_H a partir de los resultados de rO_2 , es graficar $\ln(rO_2)$ en función del tiempo (figura 7.2.2). Otro método es modelar el sistema en AQUASIM.

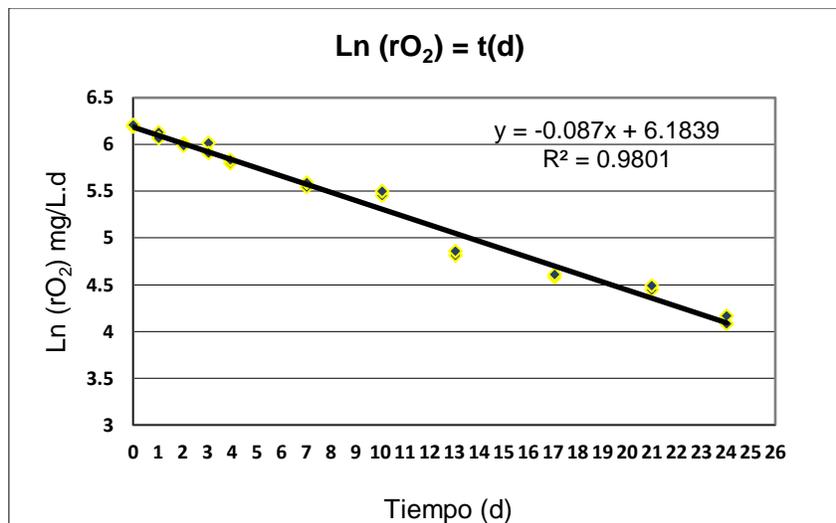


Figura 7.2.2. Logaritmo natural de la gráfica de la tasa de consumo de oxígeno del digestor aerobio respecto al tiempo en días.

Se obtuvo un coeficiente de determinación de ($R^2= 98 \%$) mientras que la pendiente del $b'H=0.087$ d^{-1} . Considerando un valor de f_p de 0.08 y un Y_H de 0.67 (tomados de referencia del ASM1), se

hizo el cálculo de $b_H = 0.23 \text{ d}^{-1}$ basado en el ASM1, de acuerdo con la ecuación $b'H / b_H = 1 - YH (1 - fp)$ (tabla 7.2.4).

Tabla 7.2.4. Tabla con los cálculos de b_H vs $b'H$ prima.

b'H prim (dia⁻¹)	bH (d⁻¹)	Valores de referencia de ASM1 (20°C)		Calculo b_H vs $b'H$
		fp	YH	1-YH (1-fp)
0.087	- 0.23	0.08	0.67	$1 - 0.67 * (1 - 0.08) = \mathbf{0.3836}$

Donde:

- $b'H$ constante de decaimiento (respiración endógena)
- b_H decaimiento de los heterótrofos (vía muerte regeneración)
- fp fracción de biomasa que se transforma en productos inertes
- YH rendimiento de los heterótrofos

*El valor de b_H que se obtuvo fue de 0.23 en vez de 0.62 d^{-1} del ASM1 a 20°C.

Al realizar una comparación del valor obtenido en la presente investigación con los resultados reportados en otras investigaciones (tabla 7.2.5) se puede observar que el resultado se acerca más a los valores obtenidos por Cox (2004) y Espinosa y Rodriguez et al (2012), mientras que difieren con los valores de Henze et al. (2002), Hauduc et al. (2010) y GPS-X que son más altos. La lenta descomposición de la biomasa heterótrofa pudo deberse a que la población dominante en el digestor no eran los heterótrofos ordinarios.

Tabla 7.2.5. Comparación de b_H (d^{-1}) a 20°C.

Henze et al., 2002	Hauduc et al., 2010	GPS-X	Espinosa-Rodríguez et al., 2012	Cox, 2004	Valor obtenido
0.62	0.62	0.62	0.4	0.35	0.23

Los valores de b_H que se reportan en la tabla 7.2.5 corresponden al promedio, existiendo valores máximos y mínimos. Así por ejemplo Cox (2004) presenta resultados de b_H en un rango de 0.05 a 1.6 d^{-1} a la temperatura de 20°C. Por lo anterior se puede decir que hay un b_H para cada lodo y cada planta en particular (Henze et al., 2002).

Hay pocos trabajos que reportan claramente valores de b_H para lodo cultivado con agua residual sintética (lodo modelo). Abdallah et al. (2010) mencionan un valor a 20°C de b_H de 0.237 (b_H : 0.62), muy similar a algunos valores reportados en la tabla 7.2.5 (b_H : 0.62, Henze et al., 2002), totalmente concordante con el valor sugerido por defecto para las plantas de aguas municipales (b_H : 0.62, Henze et al., 2002). Se puede entonces concluir que el b_H evaluado por respirometría del lodo modelo en esta investigación difiere del promedio para agua municipal (b_H : 0.62).

Se hizo una regresión lineal con los datos de DQOx y rO_2 (figura 7.2.3 y 7.2.4) para ver si los resultados seguían la misma tendencia de degradación. En la figura 7.2.4 se puede observar que la rO_2 y DQOx están correlacionados, con una $R^2 = 0.9542$.

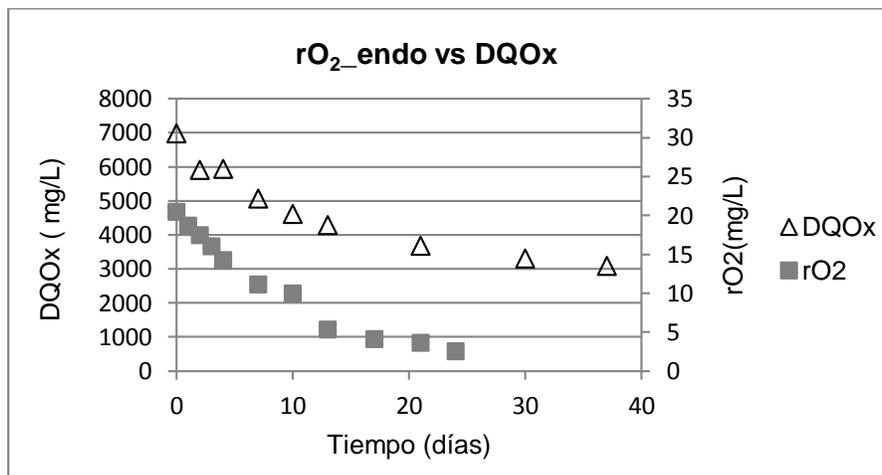


Figura 7.2.3. Gráfica con los datos de rO_2 y DQOx obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.

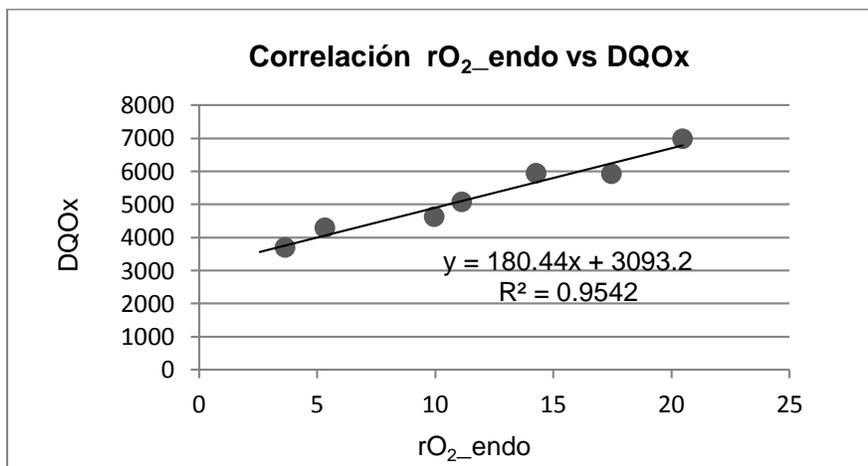


Figura 7.2.4. Regresión lineal con los datos de rO_2 vs DQOx obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.

7.2.1.3. Modelación, análisis de sensibilidad y estimación de parámetros en AQUASIM

La matriz simplificada que se muestra en la tabla 6.2.2 fue la que se usó para la modelación en AQUASIM. En el programa se ingresaron las variables, los procesos y los compartimentos los cuales se muestran a continuación (figura 7.2.5):

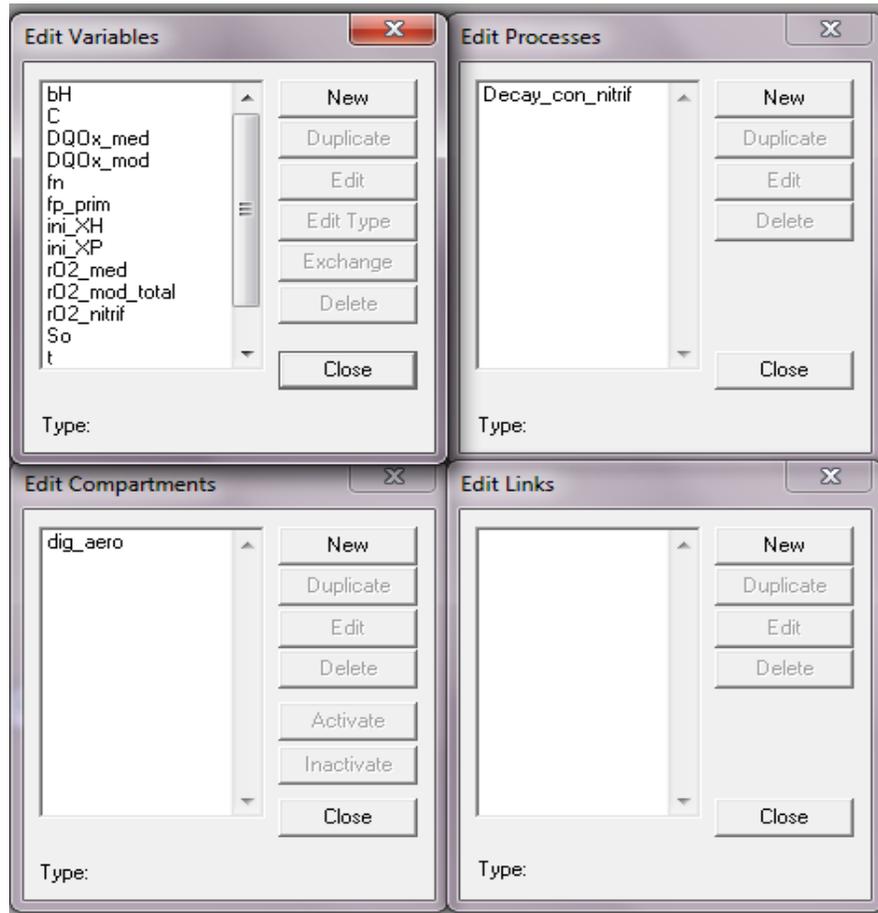


Figura 7.2.5. Imagen de las ventanas donde se ingresan las variables, los compartimentos, los procesos y las ligas en AQUASIM.

7.2.1.3.1. Características y modelado de los respirogramas

En la modelación del lodo los respirogramas endógenos (digestión aerobia) mostraron una sola fase exponencial (ASM 1) que era lo esperado (figura 7.2.6 y 7.2.7).

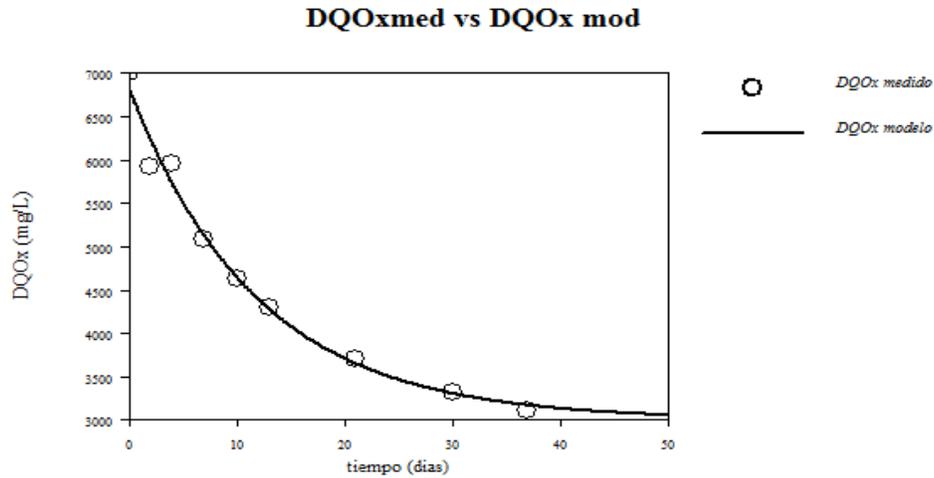


Figura 7.2.6. Respirograma donde se muestra la curva de DQOx medido vs DQOx del modelo.

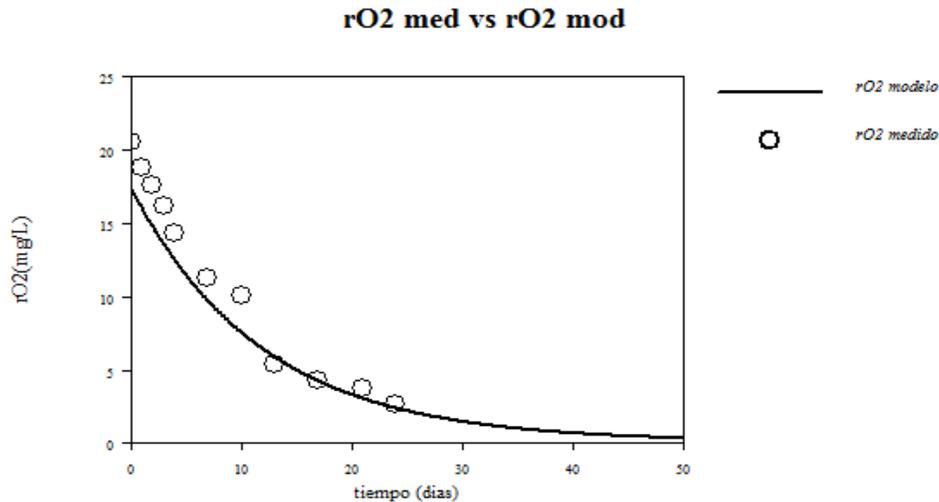


Figura 7.2.7. Respirograma donde se muestra la curva de rO₂ medido vs rO₂ del modelo.

7.2.1.3.2. Análisis de sensibilidad y estimación de los parámetros

Las funciones de sensibilidad muestran que la concentración de los residuos endógenos ini_XP no se pueden estimar utilizando sólo los datos respirométricos, por lo que podemos decir que la rO₂ tiene sensibilidad cero con respecto a ini_XP. Los valores estimados de los parámetros y sus desviaciones estándar se muestran en la tabla 7.2.7.

Tabla 7.2.6. Estimación de las variables constantes utilizando los datos de DQOx medido y rO₂ medido en AQUASIM.

Estimación de Parámetros				
Variables constante	Estimación con base a la DQOx medido	DE	Estimación con base a la rO₂ medido	DE
b´H (d⁻¹)	0.08	0.012	0.09	0.004
bH	0.25	-----	0.23	-----
ini_XH (mg/L DQO)	4816.4	243.8	5478.3	209.5
ini_XP (mg/L DQO)	2022.1	229.5	-----	

Como se muestra en la tabla 7.2.6, el lodo estudiado fue de lenta descomposición ($b' H < 0.1 \text{ d}^{-1}$), en comparación con 0.2 d^{-1} , que es el valor comúnmente aceptado para los organismos heterótrofos ordinarios. Otros lodos procedentes de las plantas EBPR fueron estudiados por Friedrich y Takács (2013), estuvieron en los mismos rangos ($b' H 0.07 \text{ d}^{-1}$). En un estudio relacionados anteriormente Martínez-García et al. (2014) determinaron que la identidad de los heterótrofos dominantes en el lodo estudiado no era ordinaria, lo más probable es que fueran PAOs o GAOs por su baja tasa de descomposición ($0.03\text{-}0.04 \text{ d}^{-1}$) (Wentzel et al, 1989b; Vargas et al., 2013). Reconviertiendo el b_H , los valores fueron similares a los obtenidos en la tabla 7.2.4

La fracción activa inicial F_a ($ini_XH \text{ mg/L}_{DQO}$) fue del 69% siendo la DQO total inicial de 7020 mg/L_{DQO} y la ini_XH de $4,816 \text{ mg/L}_{DQO}$. Además la fracción activa medida por respirometría (ini_XH de $5,478 \text{ mg/L}_{DQO}$) fue más alta que el valor de F_a determinado por la DQO.

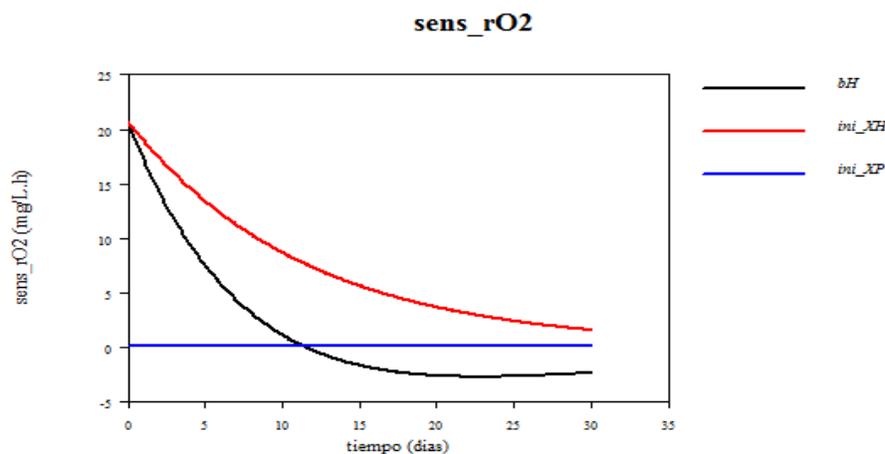


Figura 7.2.8. Análisis de sensibilidad de b_H , ini_XH e ini_XP utilizando los datos de rO_2 medido en AQUASIM.

En la figura 7.2.8 se observa que la rO_2 tiene sensibilidad cero con respecto a ini_XP por lo que no es identificable con los datos de rO_2 , por otro lado no se detectó simetría o paralelismo entre las variables constantes esto demuestra que son identificables a partir de los respirogramas.

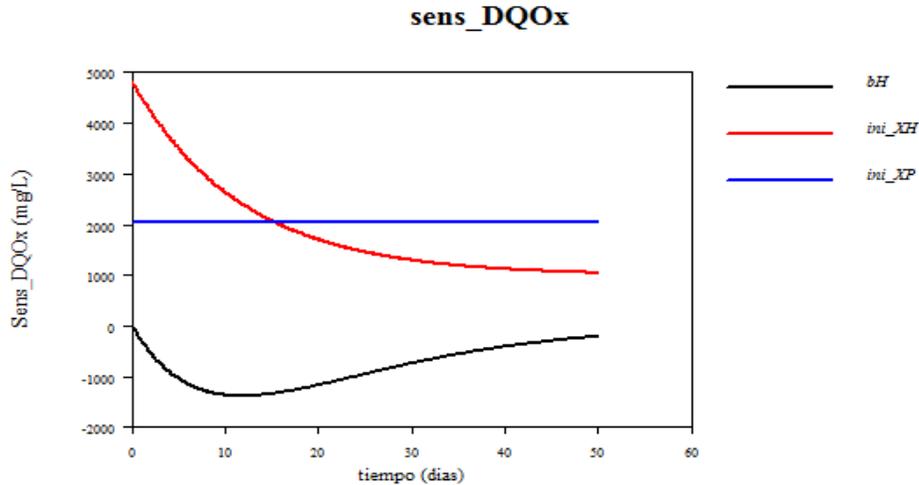


Figura 7.2.9. Análisis de sensibilidad de b_H , ini_XH e ini_XP utilizando los datos de DQOx medido en AQUASIM.

En la figura 7.2.9 se puede observar que en general el modelo para DQO es sensible a todos los parámetros (b_H , ini_XH e ini_XP), por lo que se puede decir que son perfectamente identificables (no dependientes).

7.2.1.4. Medición del porcentaje de bacterias vivas y muertas de la digestión aerobia por espectroscopía de fluorescencia

Se graficaron las longitudes de onda de cada suspensión que contenía el licor (figura 7.2.10), posteriormente se calculó la relación de la intensidad integrada de cada espectro entre 510-540 nm ($em1$; verde) y 620-650 nm ($em2$; rojo) (tabla 7.2.7).

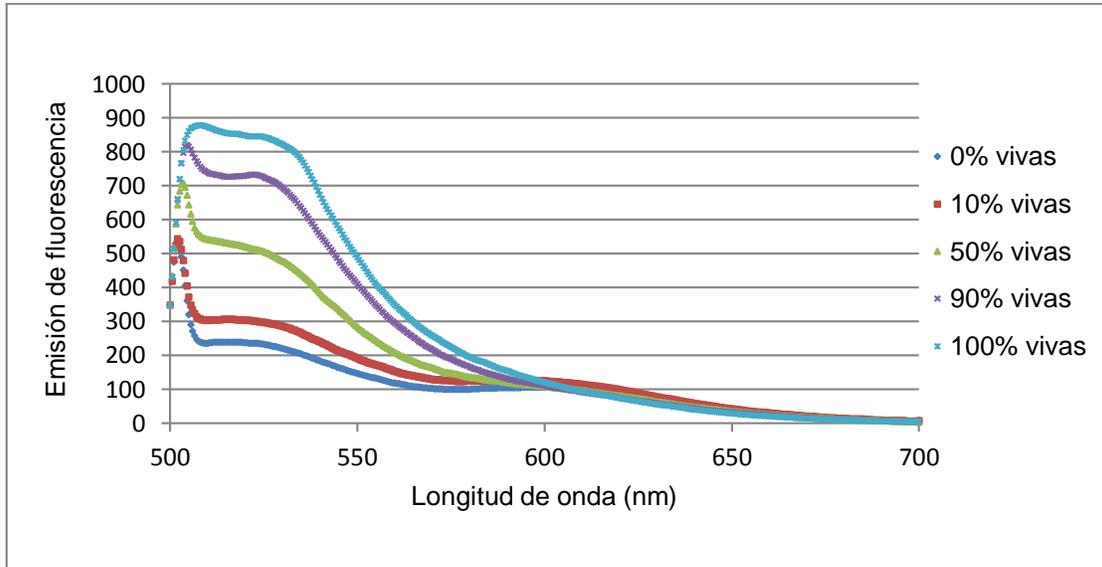


Figura 7.2.10. Intensidad de fluorescencia de los diferentes estándares de células muertas y vivas en el LA.

Se hizo una corrección en la integración de la fluorescencia, debido a que el estándar que se tomó como 100% vivo tenía aproximadamente un 25% de X_p (residuos inertes de biomasa muerta), este valor se obtuvo en AQUASIM con la ecuación $XH/(X_p+XH)=75\%$, utilizando los datos de la DQOx.

Para la obtención del porcentaje efectivo de la F_a (fracción activa) se usó la siguiente ecuación para corrección de integración de la fluorescencia:

$$\% Fa = \frac{(\text{Vol. vivos} * 75\% + \text{V. muertos} * 0\%)}{(\text{V. vivos} + \text{Vol. muertos})}$$

Tabla 7.2.7. Relación de integración de la fluorescencia em1 (vivas) y em2 (muertas), con la corrección de la biomasa viva de 75%.

% Nominal	Volúmenes		% Efectivo	I em1/em2
	Vivo	Muerto		
100	1000 μL	0 μL	75	18.65
90	900 μL	100 μL	67.5	17.89
50	500 μL	500 μL	37.5	11.43
10	100 μL	900 μL	7.5	7.70
0	0 μL	1000 μL	0	3.78

Con la integración de la fluorescencia corregida em1 (vivas) y em2 (muertas), se pudo graficar la curva de calibración que se muestra en la figura 7.2.11.

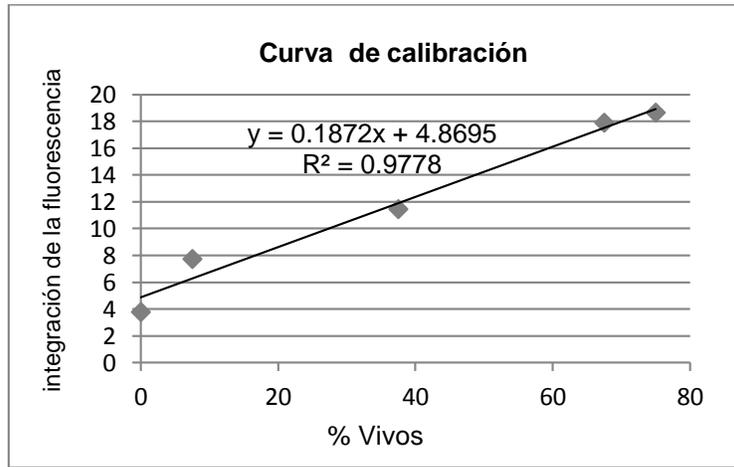


Figura 7.2.11. Curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas con la corrección de Fa (75%).

Con los valores de **a** y **b** de la ecuación de la curva de calibración, se obtuvo el porcentaje de biomasa viva en los análisis de espectrofluorometría.

Tabla 7.2.8. Ecuación de la recta de la curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas con la corrección de Fa (75%).

y=ax+b	
	Curva corregida Fa= 75%
a	0.1872
b	4.8695

Con base en la ecuación de la curva de calibración corregida con un Fa de 75% de la (figura 7.2.11, tabla 7.2.8), se generaron los resultados de porcentaje de bacterias vivas y muertas (x) en el digestor respecto al tiempo (tabla 7.2.9).

De la ecuación de la recta, se despejo x para obtener el porcentaje de microorganismos vivos

$$x = (y-b)/a$$

Tabla 7.2.9. Resultados de emisiones de onda, integración de la fluorescencia y % de microorganismos vivos en el digester aerobio en base al análisis de espectroscopia de fluorescencia.

Día	Fecha	530 nm (em1)	640 nm (em2)	I em1/em2	DE	Promedio	% Vivos
0	27/01/2015	776.61	41.64	18.65	1.01	19.36	77.42
		822.04	40.94	20.08			
2	29/02/2015	969.20	64.82	14.95	1.63	16.11	60.03
		922.94	53.47	17.26			
7	03/02/2015	910.01	74.30	12.25	0.76	12.78	42.28
		959.09	72.00	13.32			
10	06/02/2015	613.54	54.20	11.32	0.35	11.07	33.14
		619.56	57.22	10.83			
13	09/02/2015	337.27	97.17	3.47	0.57	3.87	-5.33
		388.73	90.99	4.27			
17	13/02/2015	388.00	60.17	6.45	-----	6.45	8.43
		-----	-----	-----			
21	17/02/2015	375.31	51.28	7.32	-----	7.32	13.09

Como se puede observar en la tabla 7.2.10 el porcentaje de bacterias vivas en general fue disminuyendo respecto al tiempo, a excepción del día 17 de monitoreo donde empezó a incrementar, esto puede relacionarse con lo reportado por Saadi et al. (2006) que se dieron cuenta que en algunos casos la intensidad de fluorescencia aumenta por la formación de nuevo material fluorescente asociado con la biodegradación de la materia orgánica disuelta (MOD) y/o la degradación de ciertos componentes orgánicos que desactivan la fluorescencia de la MOD (cuando el fluoróforo que está en disolución interacciona con otras moléculas y ocasiona una pérdida de emisión de fluorescencia).

Se hicieron correlaciones del porcentaje de bacterias vivas con los datos de DQOx y rO₂ (de la figura 7.2.12 a la 7.2.15) para ver si los resultados seguían las mismas tendencias de degradación.

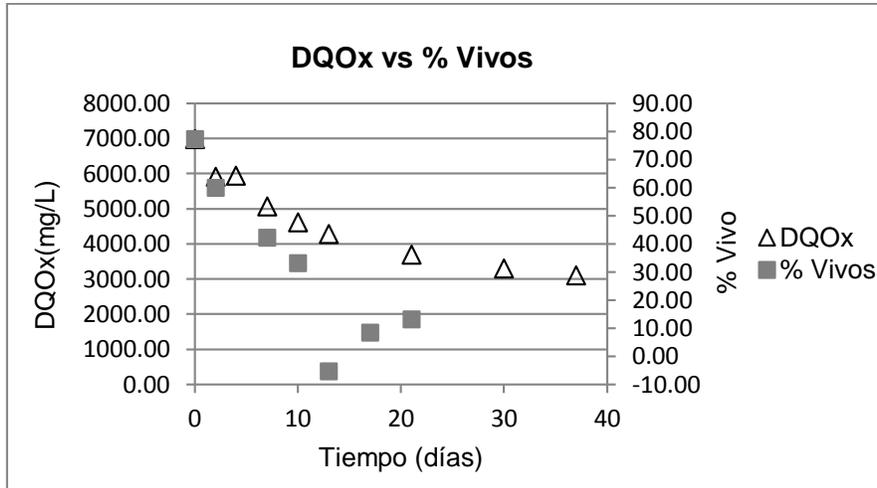


Figura 7.2.12. Grafica con los datos de DQOx y % vivos obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.

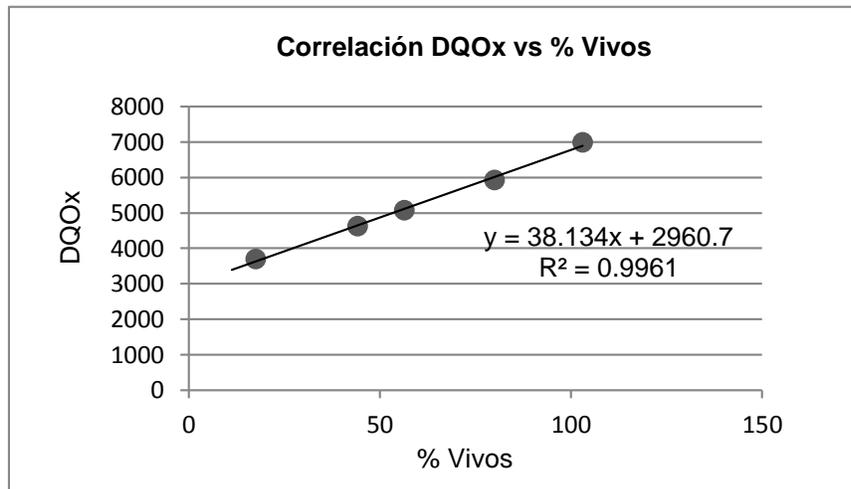


Figura 7.2.13. Regresión lineal con los datos de DQOx vs % vivos obtenidos en el monitoreo del digestor aerobio.

En la figura 7.2.13 se puede observar que la DQOx y los datos de porcentaje de bacterias vivas tienen una buena correlación, con una $R^2 = 0.9961$. Para poder hacer la regresión lineal solo se tomaron los datos de % vivos hasta el día 13 del monitoreo, que eran los resultados que seguían la tendencia de la degradación.

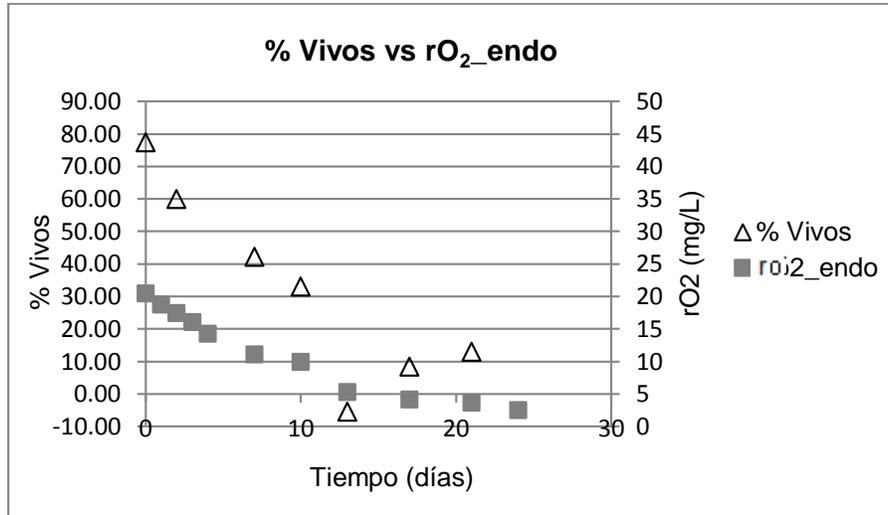


Figura 7.2.14. Grafica con los datos de % vivos y rO₂ obtenidos en el monitoreo del digester aerobio.

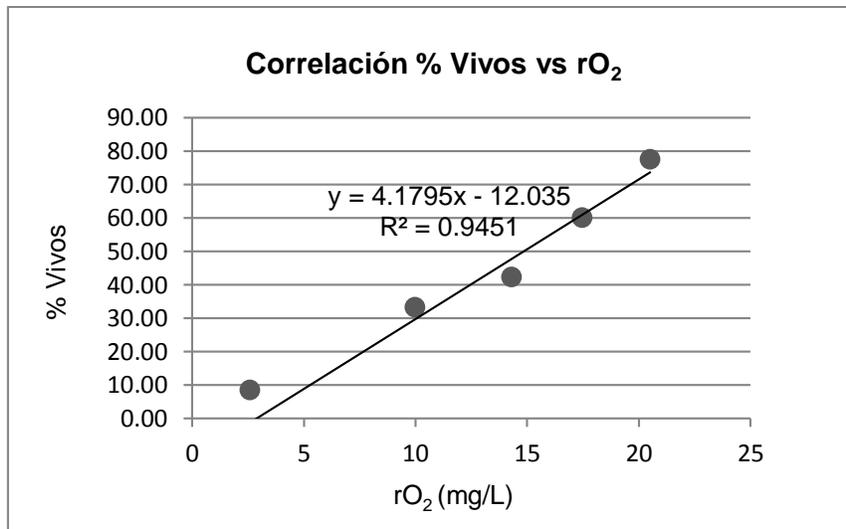


Figura 7.2.15. Regresión lineal con los datos de % vivos vs rO₂ obtenidos en el monitoreo del digester aerobio.

La figura 7.2.15 muestra una buena correlación entre los datos de % vivos y la rO₂, teniendo una $R^2 = 0.9451$. Al igual que en la figura 7.2.13 en la regresión lineal solo se tomaron los datos de % vivos hasta el día 13 del monitoreo.

La espectroscopía de fluorescencia puede evaluar el desempeño del proceso de minimización de lodo activado en un ambiente aerobio hasta cierto tiempo de la digestión, ya que en algún momento cuando empieza haber mucho producto soluble debido a la lisis de las bacterias

degradadas la intensidad de fluorescencia puede aumentar por la formación de nuevo material fluorescente como lo reporta Saadi et al. (2006).

7.2.2. Valoración de la minimización de lodos en base a la rO_2 en un lodo modelo tratado con diferentes concentraciones de ozono por DQO, respirometría y espectroscopia de fluorescencia

7.2.2.1. Mediciones de la DQO para la valoración de la minimización de lodos en un lodo modelo tratado con diferentes concentraciones de ozono

Los resultados de los análisis de la DQO total (tabla 7.2.10) y la DQO soluble (tabla 7.2.11) en la valoración de los tratamientos de ozonación se muestran a continuación

Tabla 7.2.10. Valores de DQO total en los diferentes tratamientos con ozono.

DQO total									
Tratamientos O_3	08/01/2015			14/01/2015			23/01/2015		
	Promedio	DE	C.V. (%)	Promedio	DE	C.V (%)	Promedio	DE	C.V. (%)
LM (0 min)	997.5	2.1	0.2	1138.5	14.9	1.3	-----	4.2	0.7
T1 (1 min)	869.5	29	3.3	972	11.3	1.2	955	12.7	1.3
T2 (2 min)	892.5	27.6	3.1	971.5	2.1	0.2	931	12.7	1.4
T3 (3 min)	868	15.6	1.8	855	28.3	3.3	902	48.1	5.3
T4 (4 min)	846	5.7	0.7	1015	5.7	0.6	924	12.7	1.4
T5 (5 min)	887	17	1.9	970	22.6	2.3	878.5	0.7	0.1

Tabla 7.2.11. Valores de DQO soluble en los diferentes tratamientos con ozono.

DQO soluble									
Tratamientos O_3	08/01/2015			14/01/2015			23/01/2015		
	Promedio	DE	C.V. (%)	Promedio	DE	C.V (%)	Promedio	DE	C.V. (%)
LM (0 min)	13	4.24	32.64	20.5	2.12	10.35	24.5	3.54	14.43
T1 (1 min)	49	---	-----	53	----	-----	55	----	-----
T2 (2 min)	83	---	-----	84	----	-----	92	----	-----
T3 (3 min)	111	---	-----	109	----	-----	126	----	-----
T4 (4 min)	132	---	-----	128	----	-----	131	----	-----
T5 (5 min)	189.5	2.12	1.12	172.5	10.61	6.15	180	12.73	7.07

En los resultados de DQO se puede observar que mientras fue aumentando el tiempo de ozonación, la DQO soluble fue incrementando significativamente mientras la DQO total bajo ligeramente, esto se debe al efecto de solubilización que tiene el ozono en las células (Chia-Jung et al. 2012), por lo que conforme fue incrementando el tiempo de contacto del O₃ en el licor fue aumentando la DQO soluble en este mismo.

7.2.2.2. Mediciones de la rO₂ para la valoración de la minimización de lodos en un lodo modelo (PTN) tratado con diferentes concentraciones de ozono

Las pruebas respirométricas para la evaluación de la minimización de lodos con los diferentes tratamientos de ozono se realizaron de acuerdo al procedimiento recomendado. En cada medición de la rO₂ las condiciones de temperatura y aireación en la muestra se mantuvieron constantes durante el análisis. Los resultados de las pruebas se muestran en la tabla 7.2.13.

Tabla 7.2.12. Mediciones de consumo de oxígeno de lodo modelo tratado a diferentes tiempos de ozonación.

Tratamientos O ₃	14/01/2015			23/01/2015		
	rO ₂ ini (mg/L.h)	DE	%	rO ₂ ini (mg/L.h)	DE	%
LM (0 min)	45.37	1.27	100	41.64	2.65	100
T1 (1 min)	26.76	1.05	58.99	23.26	0.93	55.87
T3 (3 min)	10.57	0.49	23.3	9.16	0.9	21.99
T5 (5 min)	3.82	1.18	8.41	4.38	1.74	10.51

Las tasas de consumo de oxígeno que se muestran en la tabla 7.2.13 fueron mayores en las muestras que tuvieron menos tiempo de ozonación.

Se hizo una regresión lineal con los datos de DQO_x y rO₂ (de la figura 7.2.16 a la 7.2.19) para ver si los resultados de los diferentes tratamientos con ozono seguían la misma tendencia de degradación.

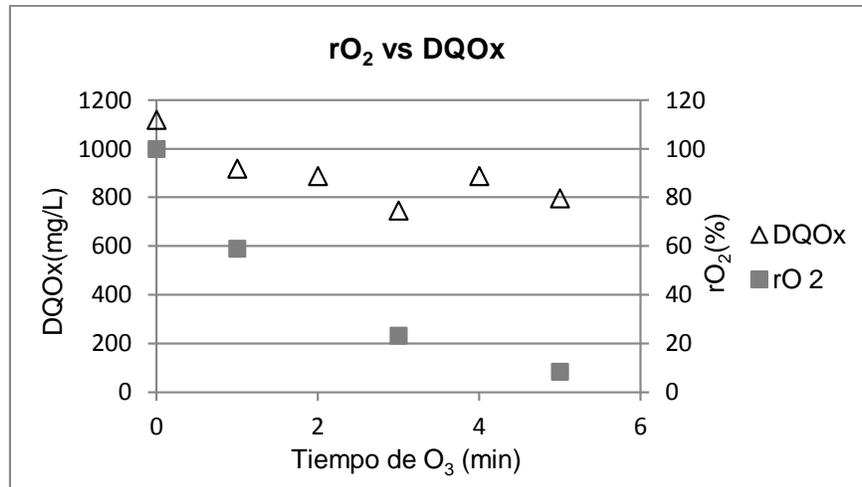


Figura 7.2.16. Grafica con los datos de rO₂ y DQOx obtenidos en los diferentes tratamientos con ozono (0,1 ,3 y 5 minutos) del día 14 de enero del 2015.

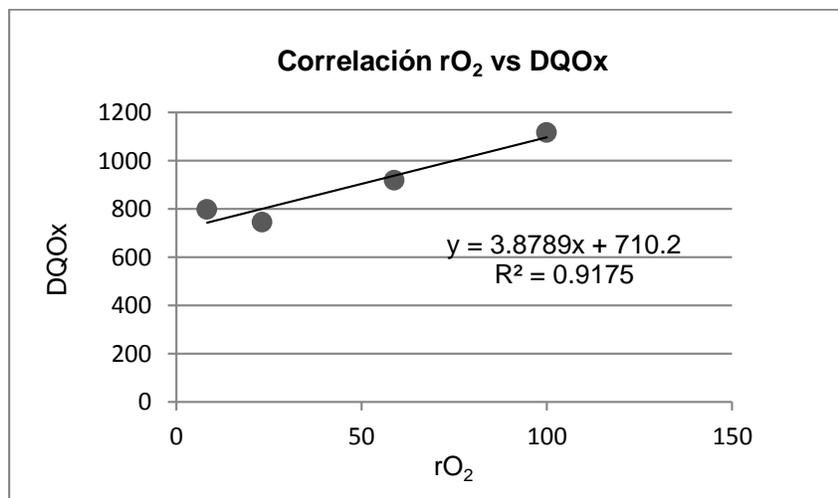


Figura 7.2.17. Regresión lineal con los datos de rO₂ vs DQOx obtenidos en los diferentes tratamientos con ozono (0,1 ,3 y 5 minutos) del día 14 de enero del 2015.

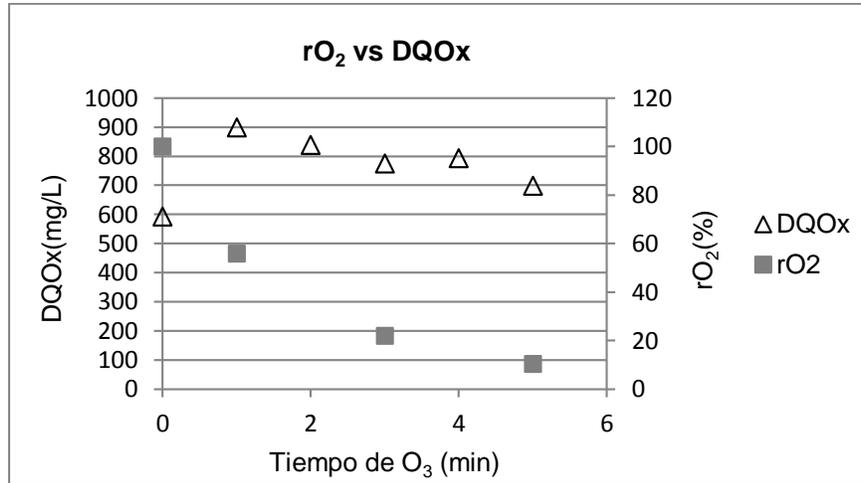


Figura 7.2.18. Grafica con los datos de rO₂ y DQOx obtenidos en los diferentes tratamientos con ozono (0,1 ,3 y 5 minutos) del día 23 de enero del 2015.

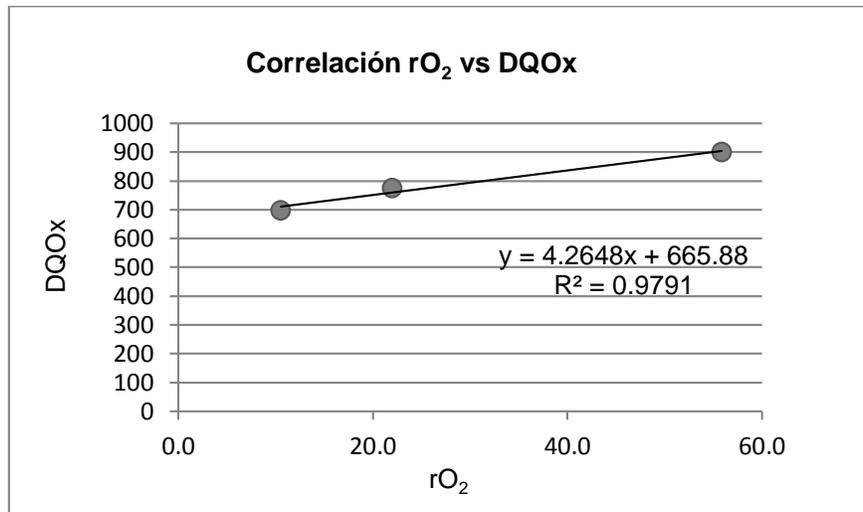


Figura 7.2.19. Regresión lineal con los datos de rO₂ vs DQOx obtenidos en los diferentes tratamientos con ozono (0,1 ,3 y 5 minutos) del día 23 de enero del 2015.

En la figura 7.2.17 y 7.2.19 se puede observar que la rO₂ y DQOx tienen una buena correlación, con una R²= 0.9175 y 0.9791 respectivamente, lo que indica que siguen la misma tendencia y son viables para valorar la minimización de lodos por ozonación.

7.2.2.3. Mediciones del porcentaje de bacterias vivas espectroscopía de fluorescencia en un lodo modelo tratado con diferentes concentraciones de ozono

Se graficaron las longitudes de onda de cada suspensión que contenía el licor (figura 7.2.20), posteriormente se calculó la relación de la intensidad integrada de cada espectro entre 510-540 nm (em1; verde) y 620-650 (em2; rojo) (tabla 7.2.13) para poder graficar la curva de calibración y sacar la ecuación de la recta (figura 7.2.21).

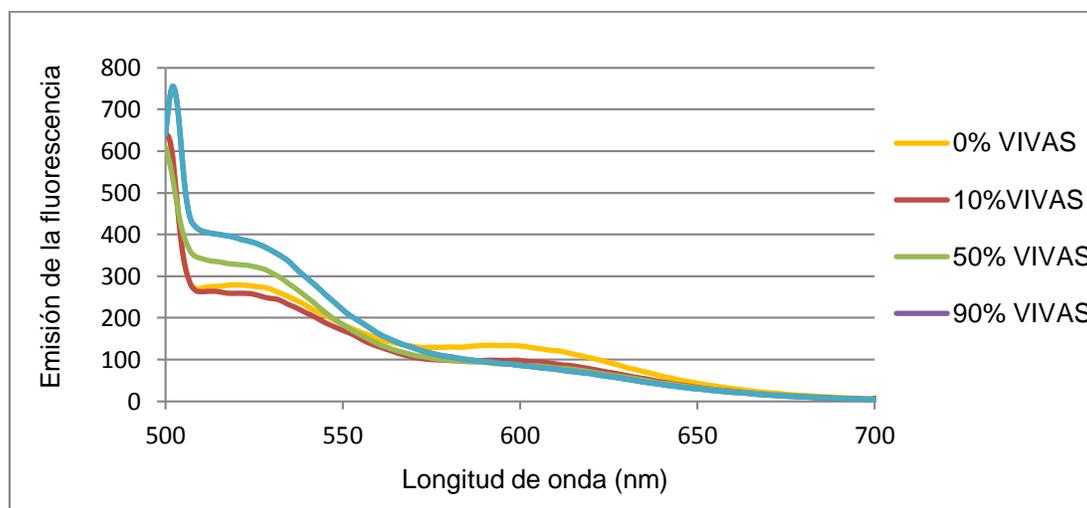


Figura 7.2.20. Intensidad de fluorescencia de los diferentes estándares de células muertas y vivas del lodo PTN, para la valoración de los tratamientos a 0,1 ,2 ,3 ,4 y 5 minutos de ozonación.

Tabla 7.2.13. Relación de integración de la fluorescencia em1 (vivas) y em2 (muertas) del lodo PTN para la valoración de los tratamientos a 0,1 ,2 ,3 ,4 y 5 minutos de ozonación.

% Vivos	530 nm (em1)	640 nm (em2)	I em1/em2
100	361.28	40.33	8.96
90	361.28	40.33	8.96
50	361.28	43.24	8.36
10	246.31	46.58	5.29
0	267.80	60.55	4.42

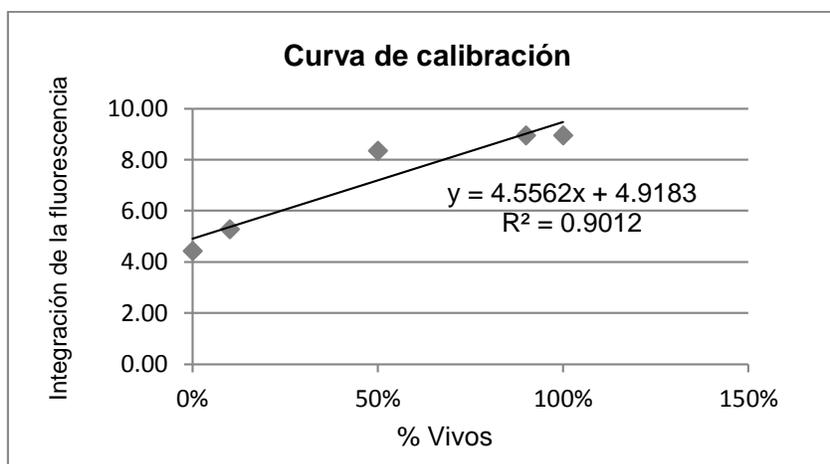


Figura 7.2.21. Curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas en el lodo PTN para la valoración de los tratamientos a 0,1 ,2 ,3 ,4 y 5 minutos de ozonación.

Con base a la ecuación de la recta (tabla 7.2.14) de la curva de calibración (7.2.21), se generaron los resultados de porcentaje de bacterias vivas y muertas (x) en los diferentes tratamientos con ozono (tabla 7.2.15).

Tabla 7.2.14. Ecuación de la recta de la curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas en el lodo PTN para la valoración de los tratamientos a 0,1 ,2 ,3 ,4 y 5 minutos de ozonación..

y=ax+b	
a	4.5562
b	4.9183

Tabla 7.2.15. Resultados de la integración de fluorescencia y porcentaje de vivos en los diferentes tratamientos con ozono.

Tratamientos O ₃	08/01/2015					14/01/2015					23/01/2015				
	I em1/em2	DE	% Vivos		I em1/em2	DE	% Vivos		I em1/em2	DE	% Vivos				
LM (0 min)	10.6	9.9	0.5	122.9	108.7	17.7	18.9	0.8	267	291.1	11.1	9.5	1.1	133.5	100.9
T1 (1 min)	10.1	4.4		112.7	-3.2	10.3	12.1	1.2	117.5	153.1	9.2	9	0.1	94.5	90.5
T2 (2min)	6.4	6.6	0.1	37.5	41.6	8	8.7	0.5	69.8	84.4	4.6	9		0.2	91
T3 (3 min)	4.3	5	0.5	-5.2	9	5.5	3.4	1.5	20.1	-22.8	6	5.4	0.4	28.8	18.1
T4 (4 min)	5.2	6.6	1	13.1	41.6	7.3	5.8	1.1	56.5	25.1	4.3	2.5	1.3	-4.5	-41.1
T5 (5min)	4.1	5.3	0.8	-9.3	15.1	5.8	4.5	0.9	24.9	-0.3	4.2	6.1	1.4	-7.6	31.5

Los resultados presentados en la tabla 7.2.16 no mostraron una coherencia entre si, a excepción de la muestra que se ozonó por 1 minuto y la muestra de lodo que no fue tratada, en donde la muestra sin tratar siempre tuvo una intensidad de fluorescencia un poco más alta que la del tratamiento de 1 min en los tres días de análisis. Esto pudo deberse a la alta solubilización que produce el ozono en las células (Chia-Jung C. et al., 2012) lo cual puede formar nuevo material fluorescente (Saadi et al. , 2006))que sesga las mediciones para valorar la degradación, por lo que las espectrofluorimetría no es una buena técnica para valorar la minimización de lodos tratados con ozono.

7.2.3. Determinación de la constante cinética μ_{Hmax} (crecimiento) en el proceso de minimización de lodos en un lodo (PTN) ozonado por espectrofluorimetría vs respirometría

7.2.3.1. Mediciones de la rO_2 en un lodo modelo ozonado por respirometría para el cálculo de la constante cinética μ_{Hmax} .

Para la obtención de μ_{Hmax} se aplicó la metodología de Kappeler y Gujer (1992) para calcular el valor del parámetro a partir de la curva respirométrica (figura 7.2.22). El experimento se desarrolló en condiciones de una relación alta de S/M, a una temperatura de 20°C, con 3 replicas para el lodo ozonado a 5 minutos y una muestra sin ozonar.

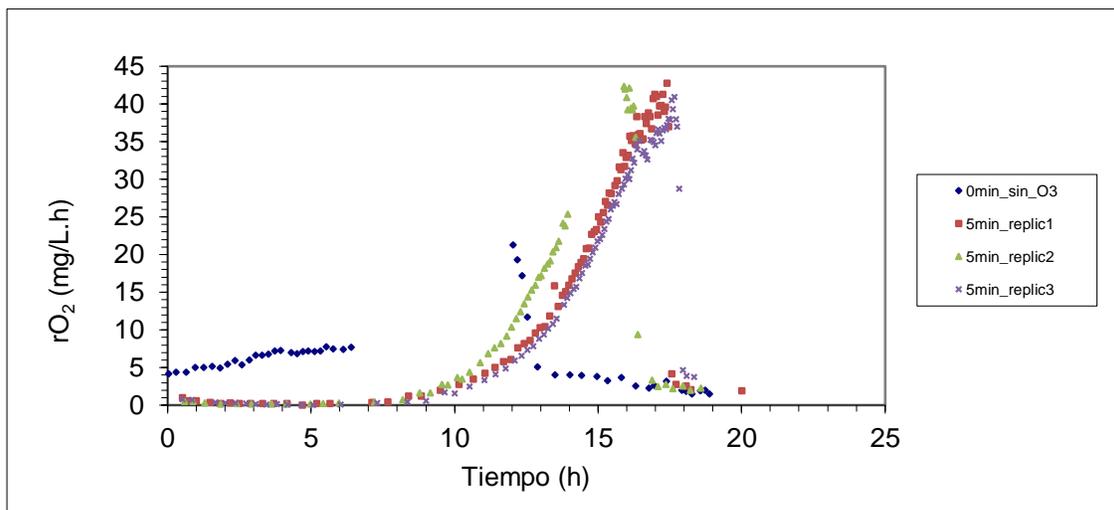


Figura 7.2.22. Curva respirométrica para la prueba de μ_{Hmax} para el lodo ozonado a 5 minutos.

Después de graficar las tasas de respiración contra el tiempo, se calculó una regresión exponencial ($y=ae^{bt}$) cuya ecuación está dada en la metodología, en donde el exponente $b= \mu_{Hmax} - b'H$.

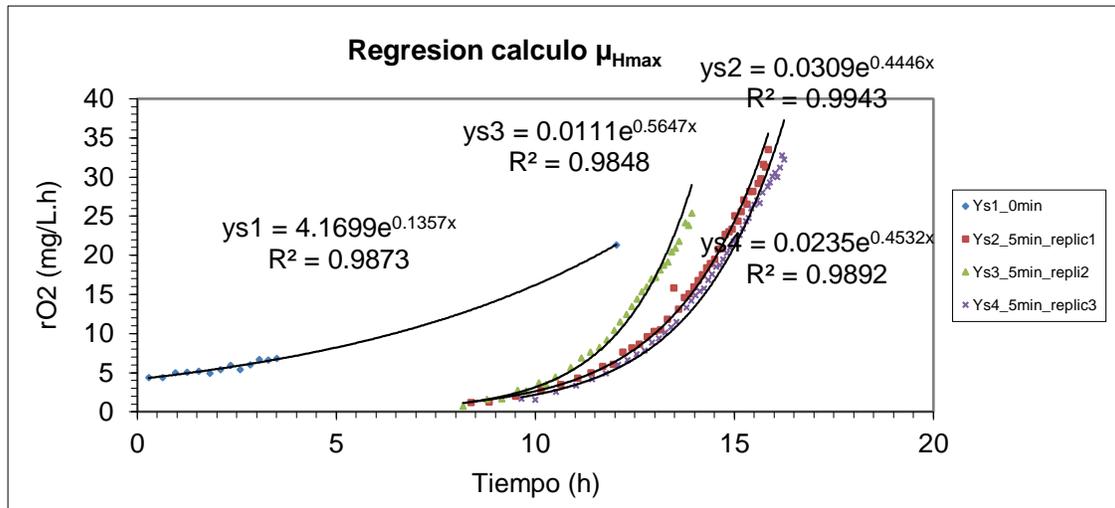


Figura 7.2.23. Respirograma de las curvas de crecimiento a 20°C para determinar μ_{Hmax} .

Se sacó el promedio del valor de $\mu_{Hmax}-b'H$ ($10.8 d^{-1}$) de las tres réplicas a 5 minutos de ozonación, los valores individuales se muestran en la tabla 7.2.16.

Tabla 7.2.16. Valores de $\mu_{Hmax}-b'H$ obtenidos del respirograma para el lodo ozonado a 5 minutos.

T. O ₃ (min)	$\mu_{Hmax}-b'H$	
	h ⁻¹	d ⁻¹
0 min (ys1)	0.136	3.3
5 min (ys2)	0.445	10.7
5 min (ys3)	0.565	13.6
5 min (ys4)	0.453	10.9

Las pendientes de la figura 7.2.23 corresponden a la diferencia ($\mu_{Hmax}-b'H$), de donde se puede calcular la tasa máxima de crecimiento específico de la biomasa heterotrófica. Siendo $b'H = 0.625 d^{-1}$ (valor de referencia de ASM1 a 20°C), entonces $\mu_{Hmax} = 10.8 d^{-1} + 0.62 = 11.42 d^{-1}$ para el lodo ozonado, comparado a $3.3 + 0.62 = 3.9 d^{-1}$ para el lodo no ozonado.

El trabajo mostró un fenómeno de incremento del tiempo de latencia y sobre todo del valor μ_{Hmax} con la ozonación (tabla 7.2.18). La ozonación seleccionó bacterias de alta tasa de crecimiento, que fueron las más resistentes al tratamiento de 5 minutos de O₃.

La tabla 7.2.17 compara valores de la tasa de crecimiento máximo, reportados en la literatura a 20°C con el valor obtenido en este trabajo para el lodo modelo.

Tabla 7.2.17. Comparación de valores de μ_{Hmax} (d^{-1}) a 20°C.

Henzel et al., 2002	Cox (2004)	Hauduc et al., 2010	GPS-X	Espinosa-Rodríguez et al., 2012	Valor obtenido	
					con O ₃	sin O ₃
6	3.12	6	6	6.9	11.4	3.9

Los valores de Henze et al. (2002), Hauduc et al., (2010) GPS-X coinciden con el valor promedio recomendado por ASM1 para agua residual municipal. En el ASM1 también está provisto que μ_{Hmax} tiene un amplio rango (2 a 12 d^{-1}) por lo que el valor obtenido en el lodo modelo (11.4 d^{-1}) entra dentro del rango para agua municipal, pero difiere del valor promedio de 6 d^{-1} .

Kappeler y Gujer (1992) propusieron determinar únicamente la μ_{Hmax} , observando el aumento de la respiración en un reactor cerrado con una relación S/M alta. Algunos autores consideran que esta alta relación S/M puede favorecer el crecimiento selectivo, resultando en valores altos de μ_{Hmax} (Vanrolleghem et al., 1999).

Es comprensible que haya variaciones en la μ_{Hmax} del agua residual sintética y del agua residual municipal, debido a las diferencias en su composición y a los tipos de microorganismos que se desarrollan en cada caso. El agua residual sintética no contiene fracción no-biodegradable (degradación más rápida), ni compuestos tóxicos, y no es seguro cada uno de los macroelementos requeridos por cada tipo de bacterias estén presentes en el agua sintética.

7.2.3.2. Medición del porcentaje de bacterias vivas y muertas en un lodo ozonado por espectroscopía de fluorescencia

Se graficaron las longitudes de onda de cada suspensión que contenía el licor (figura 7.2.24), posteriormente se calculó la relación de la intensidad integrada de cada espectro entre 510-540 nm (em1; verde) y 620-650 (em2; rojo) (tabla 7.2.18) para poder graficar la curva de calibración y sacar la ecuación de la recta (figura 7.2.25).

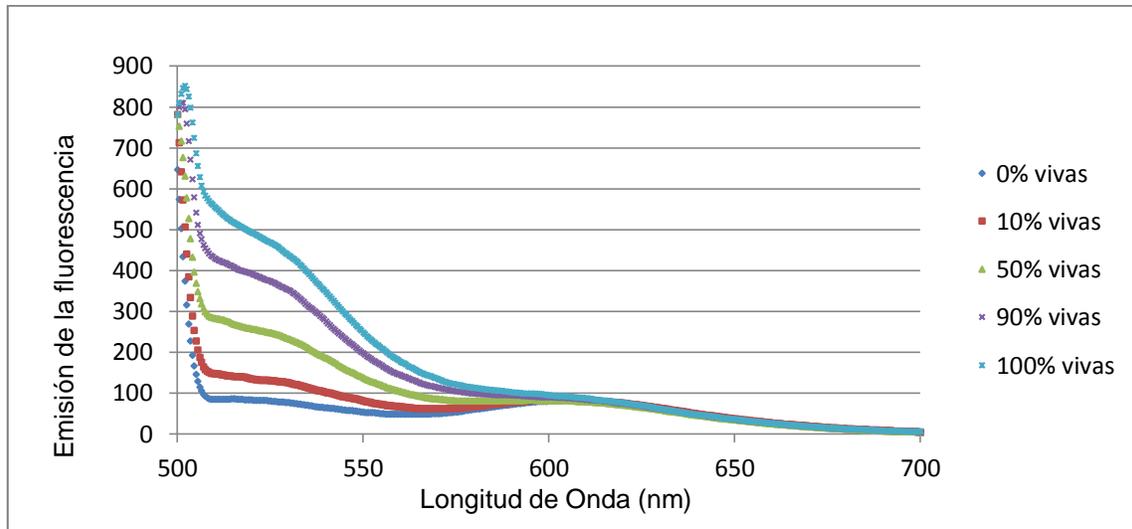


Figura 7.2.24. Intensidad de fluorescencia de los diferentes estándares de células muertas y vivas en el lodo de la PTN para la valoración de μ_{Hmax} en el tratamiento de 5 minutos de ozonación.

Tabla 7.2.18. Relación de integración de la fluorescencia em1 (vivas) y em2 (muertas) del lodo PTN para la valoración de μ_{Hmax} en el tratamiento de 5 minutos de ozonación.

% VIVOS	530 nm (em1)	640 nm (em2)	I em1/em2
100	1000 μ L	0 μ L	9.19
90	900 μ L	100 μ L	7.38
50	500 μ L	500 μ L	5.04
10	100 μ L	900 μ L	2.55
0	0 μ L	1000 μ L	1.57

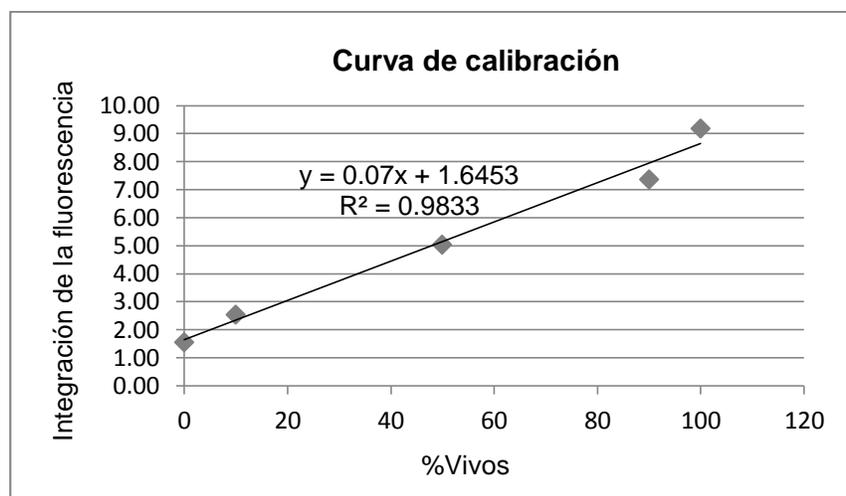


Figura 7.2.25. Curva de calibración para cuantificar el porcentaje de bacterias vivas del lodo de la PTN.

Con base en la ecuación de la recta (tabla 7.2.19) de la curva de calibración (figura 7.2.25), se generaron los resultados de porcentaje de bacterias vivas y muertas (x) en el lodo tratado por 5 minutos con ozono (tabla 7.2.20).

Tabla 7.2.19. Ecuación de la recta de la curva de calibración para cuantificar proporciones de bacterias vivas y muertas del lodo PTN tratado a 5 minutos de ozonación.

y=ax+b	
a	0.07
b	1.6453

Tabla 7.2.20. Resultados de la integración de fluorescencia y porcentaje de vivos en el lodo tratado a 5 minutos de ozonación.

Toma de muestra	t (h)	I em1/em2		DE	Promedio	% Vivos
		replica 1	replica 2			
08:40	12.2	3.7	3.6	0.1	3.7	52.3
10:20	13.8	8.2	8.3	0	8.2	117.8
11:20	14.8	8.7	10.9	1.6	9.8	140.2
12:20	15.8	10.7	10.2	0.4	10.4	149
13:20	16.8	7	7	0	7	-----
14:20	17.8	10.4	10	0.3	10.2	145.9

Como se puede observar en la tabla 7.2.21 el porcentaje de bacterias vivas fue aumentando respecto al tiempo, llegando a su máximo a partir de las 12:20 horas. El incremento en el porcentaje puede relacionarse con el crecimiento de la siembra inicial que quedo viva después del tratamiento con ozono ya que se encontraba en un medio con una relación alta de S/M (Kappeler y Gujer ,1992). Se tiene que tomar en cuenta que en este análisis no se obtuvo el valor de Fa para el lodo PTN en AQUASIM por lo que en la curva de calibración se tomo el estándar como 100% vivas, por lo que los resultados obtenidos en el monitoreo de la curva de crecimiento nos arrojan valores mayores del cien por ciento. No obstante, se detecta un incremento en los valores hasta alcanzar una meseta final alrededor de 145-148%, cuando ya se agotó el sustrato

Se hicieron correlaciones del porcentaje de bacterias vivas con los datos de rO_2 (figura 7.2.26 y 7.2.27) para ver si los resultados seguían la misma tendencia.

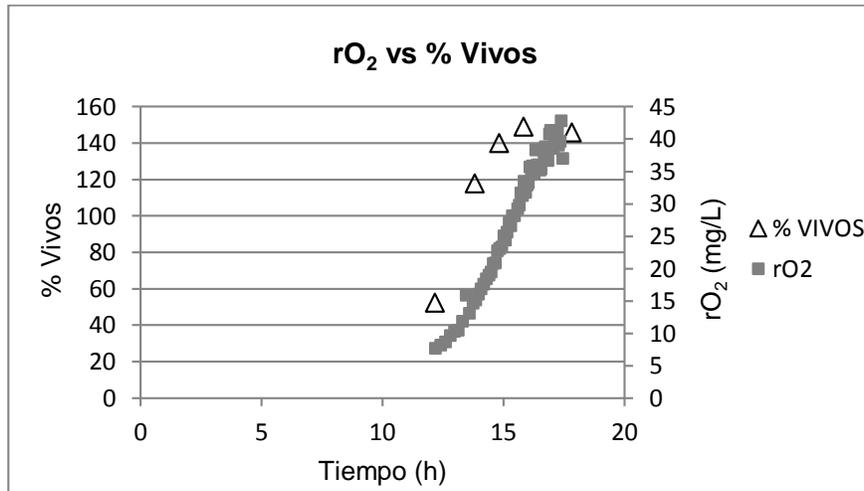


Figura 7.2.26. Grafica con los datos de % Vivos y rO_2 obtenidos del lodo tratado a 5 minutos de ozonación.

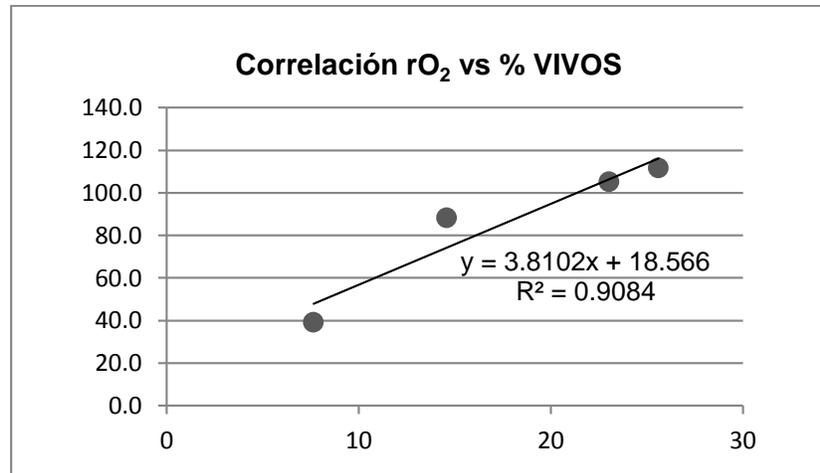


Figura 7.2.27. Regresión lineal con los datos de % vivos y rO_2 obtenidos del lodo tratado a 5 minutos de ozonación.

En la figura 7.2.27 se observa que existe una correlación entre los datos de % vivos y la rO_2 , teniendo una $R^2 = 0.9084$. En esta regresión lineal solo se tomaron los datos que siguen la tendencia del crecimiento en los dos análisis. En la figura 7.2.26 la curva de rO_2 decayó cuando se terminó el alimento que comen las bacterias por lo que bajo la demanda de oxígeno; mientras que en la curva de % vivos después de que se acabó el sustrato la población se mantuvo constante, lo que era esperado.

Por lo anterior se puede decir que la espectrofluorimetría es una técnica que puede evaluar el crecimiento de las bacterias en un ambiente con una relación alta de S/M.

7.3. Citometría de flujo (CMF)

7.3.1. Afinación del citómetro

La tabla 7.3.1 muestra la ubicación que se esperaba de las preparaciones control en los diagramas de dos parámetros.

Tabla 7.3.1. Presencia y ausencia de las preparaciones control en los diagramas.

	Vivas	Muertas
CYTO 9	+	-
Yoduro de propidio	-	+

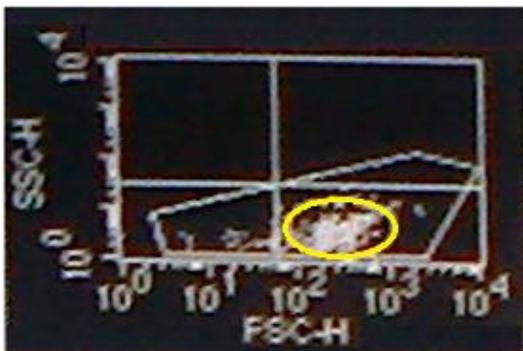
- Muestra con solo perlas de látex (preparación 5).

Tabla 7.3.2. Parámetros para la ubicación en el diagrama de la preparación 5.

Detectores	Voltaje
FSC (Tamaño)	E00
SSC (Granulidad)	500
FL1(Filtro detecta SYTO 9)	500
FL3 (Filtro detecta Yoduro de propidio)	500

En el diagrama de la figura 7.3.1 se pueden observar las perlas de látex, estas no fueron ubicadas en cuadrantes ya que son las únicas que difieren en los valores de los parámetros de las demás preparaciones. En el histograma se puede ver un solo pico bien definido donde se encuentran las perlas según su complejidad.

Diagrama de 2 parámetros



Histograma



Figura 7.3.1. Diagrama de 2 parámetros, e histograma de la preparación 5.

- Muestra células muertas con Yoduro de propidio (preparación 1).

Tabla 7.3.3. Parámetros para la ubicación en el diagrama de la preparación 1.

Detectores	Voltaje
FSC	E01
SSC	376
FL1	600
FL3	700

En el diagrama de figura 7.3.2 se observan las células muertas, su ubicación corresponde al cuadrante (-,-). En el histograma se puede ver dos picos, uno más definido que el otro, en el cual se encuentran la mayoría de las bacterias muertas según su intensidad de fluorescencia.

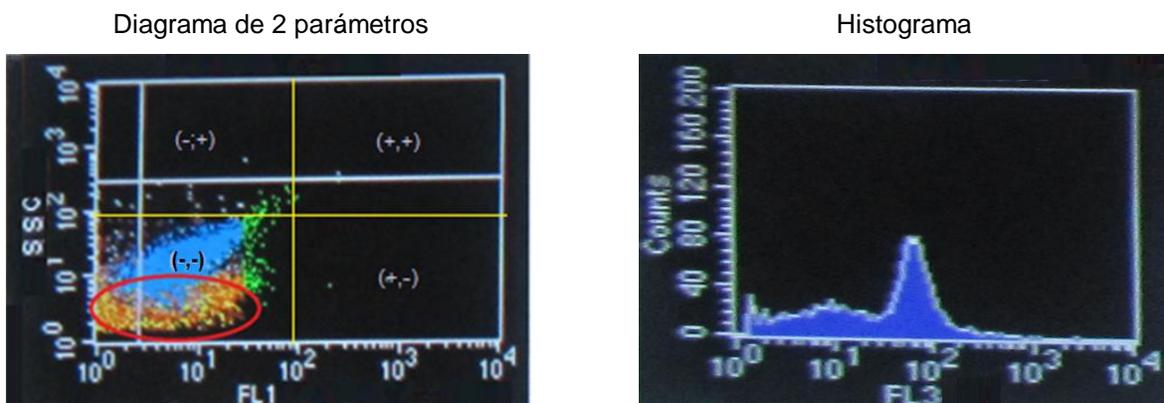


Figura 7.3.2. Diagrama de 2 parámetros, e histograma de la preparación 1.

- Muestra células vivas con SYTO 9 (preparación 2)

Tabla 7.3.4. Parámetros para la ubicación en el diagrama de la preparación 2.

Detectores	Voltaje
FSC	E01
SSC	376
FL1	600
FL3	700

En el diagrama de la figura 7.3.3 se pueden ver las células vivas, su ubicación corresponde al cuadrante (+,-).

En el histograma se observan dos picos, uno más definido que el otro, en el cual se encuentran la mayoría de las bacterias vivas según su intensidad de fluorescencia

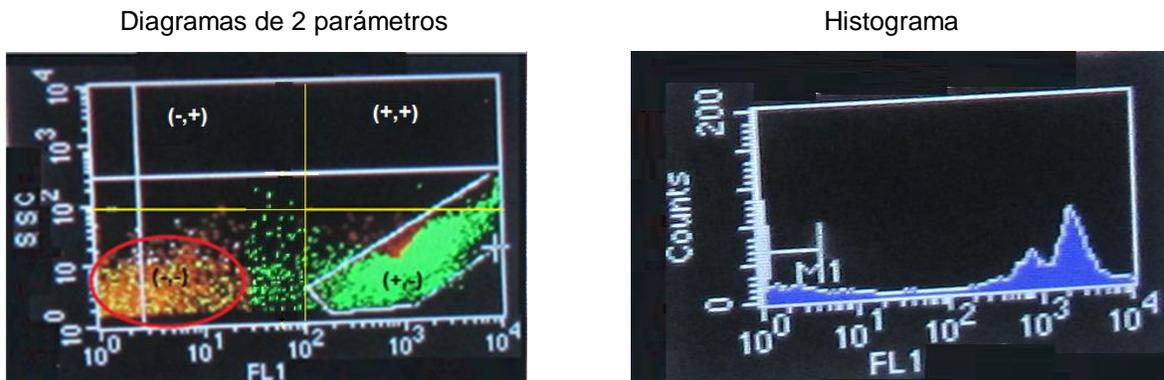


Figura 7.3.3. Diagrama de 2 parámetros, e histograma de la preparación 2.

- Muestra células vivas teñidas con SYTO 9 y Yoduro de propidio (preparación 3).

Tabla 7.3.5. Parámetros para la ubicación en los diagramas de la preparación 3.

Detectores	Voltaje
FSC	E01
SSC	376
FL1	600
FL3	700

En los diagramas de complejidad vs FL1 y FL3 de figura 7.3.4 se pueden observar las células vivas en los cuadrantes (+,-) y (-,-), mientras que las muertas se ubican en el (-,-). En el diagrama de FL1 vs FL3 las células vivas se ubican en los cuadrantes (+,+), (+,-) y (-,+), mientras que las muertas están en el cuadrante (-,-) y (-,+).

Diagramas de 2 parámetros

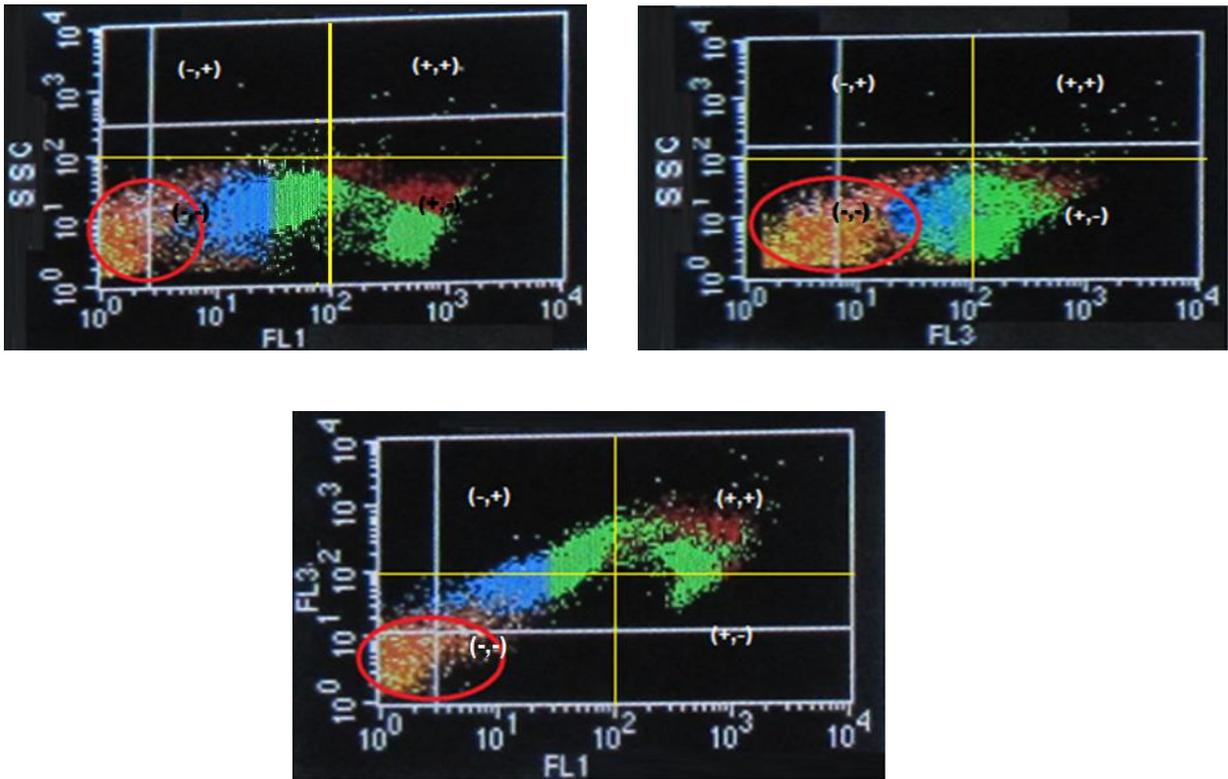


Figura 7.3.4. Diagramas de 2 parámetros de la preparación 3.

En ambos histogramas de la figura 7.3.5 se pueden observar 3 picos, en los cuales se ubican los diferentes tipos de bacterias vivas y muertas según su intensidad de fluorescencia.

Histogramas

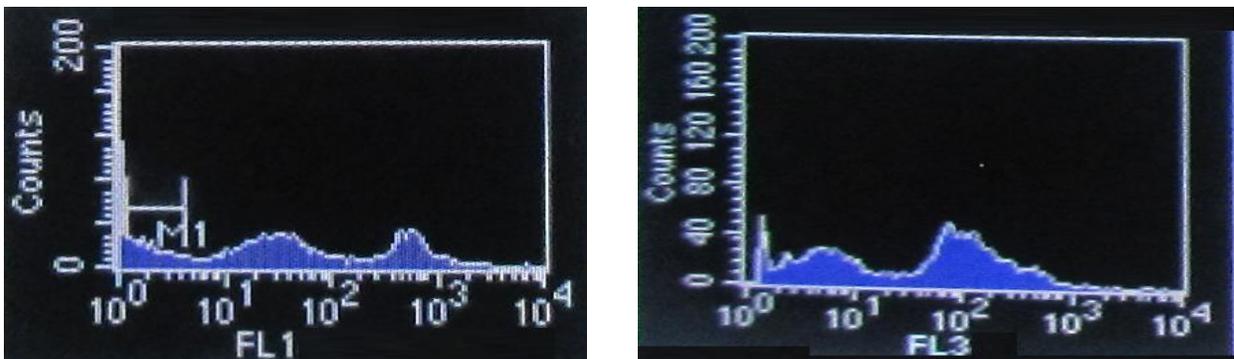


Figura 7.3.5. Histogramas de la preparación 3.

Se estuvo yendo una vez por semana durante casi un año al citómetro con muestras controles y muestras de los reactores A y B, con el fin de ajustar el equipo para poder cuantificar las diferentes poblaciones de bacterias vivas y muertas, pero durante ese periodo no se lograron ubicar las poblaciones iniciales para medirlas respecto al tiempo ya que había mucho ruido y no se sabe si era electrónico o contaminación del equipo, la cual se pudo traslapar con alguna población que se querían medir (el ruido es el que se observa dentro de los círculos rojos en las figuras 7.3.2, 7.3.3 y 7.3.4). Esta contaminación no se pudo quitar a lo largo de las pruebas, por lo que se usó la espectroscopia de fluorescencia para medir las proporciones de bacterias vivas y muertas respecto al tiempo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 Conclusiones

- 1) El tratamiento biológico de lodos activado fue eficiente, ya que remueve más del 90% de la DQO total del influente.
- 2) Una de las dificultades encontrada en el cultivo del lodo modelo fue el esponjamiento; se debió a la presencia de microorganismos filamentosos que dificultaron la sedimentación de los lodos; la situación se corrigió con proveer de más aireación.
- 3) Para poder llevar un control de los reactores manteniendo en forma constante la cantidad de sólidos suspendidos en el sistema, es necesario la realización de análisis de medición de lodos, como lo son: temperatura, conductividad eléctrica, pH, DQO_T , DQO_S , DQO_X , SST, SSV, SSF, IQV, IVT, IVL, velocidad de sedimentación, respirometría y diámetro de la partícula.
- 4) El b_H del lodo modelo medido en el digestor aerobio fue de 0.23 d^{-1} que difiere con el valor promedio en el ASM1 estimado a 0.62 d^{-1} a 20°C , por lo que puede decirse que hay un b_H para cada lodo como lo sugiere la literatura.
- 5) La μ_{Hmax} en el lodo modelo ozonado fue de 11.4 d^{-1} comparado a 3.9 d^{-1} para el lodo no ozonado, mostrando un fenómeno de selección de bacterias de alto crecimiento por la ozonación. Sin embargo ambos valores quedaron en el intervalo $2-12\text{ d}^{-1}$ aceptado en el ASM1.
- 6) En la técnica de citometría de flujo, se logró configurar el equipo para detectar las poblaciones vivas versus muertas, así como las perlas de conteo (estándar), pero no se pudieron tener más avances por fallas en el equipo, esto pudo originarse por una contaminación y/o obstrucción de los conductos del citómetro por los flocs, aunque el lodo ya había sido segregado por tratamientos de ultrasonido. Ante esta limitación, la investigación se enfocó en el uso de una técnica alterna basada en la espectroscopía de fluorescencia.
- 7) Ya sea para seguir el decaimiento (en un digestor) o para monitorear el crecimiento (en un reactor), la espectrofluorometría permite evaluar el desempeño de procesos de minimización de lodo, cuantificando la fracción de bacterias vivas y muertas; se obtuvieron

correlaciones altas de la mediciones de DQO y rO_2 con los resultados de esta técnica de fluorescencia.

- 8) La alta solubilización que produce el ozono en las células formó material fluorescente que sesgó las mediciones hechas por espectrofluorometría, por lo que no es una buena técnica para valorar la minimización de lodos tratados con ozono debido a la interferencia de los productos microbianos solubles.

8.2. Recomendaciones

- 1) Es necesario mejorar la metodología en general para el análisis del lodo activado por citometría de flujo, ya que en el presente trabajo se presentaron muchas dificultades tanto en la preparación de la muestra como el análisis de esta en el citómetro.
- 2) En cuanto a la preparación de la muestra, la mayor dificultad que se presentó fue separar las bacterias para que pudieran ser contadas de manera individual en el citómetro de flujo; se les aplicaron diferentes tratamientos de ultrasonido y posteriormente se filtraron, pero su naturaleza hacia que se juntaran de nuevo cuando empezaban a decantar en el vial, por lo que se sugiere que en trabajos futuros se busquen nuevos métodos para poder segregarlas sin que se vuelvan a juntar.
- 3) Se recomienda darle el mantenimiento semestral al citómetro (cambio de sondas y de filtros), para que no se contamine la muestra de lodo al ser analizada y su fluorescencia pueda ser detectada de forma correcta.
- 4) Falta más investigación en la afinación de voltajes en los detectores de las bacterias vivas y muertas que se presentan en los protocolos de tinción para citometría de flujo.

referencias bibliográfica

- Alcon, A., Santos, V., Casas, J. y García, F. (2003). Use of flow cytometry for growth structured kinetic model development Application to *Candida bombicola* growth. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 399-406.
- Aragón, C. (2009). Optimización del proceso de Lodos Activados para producir la generación de Fangos residuales. Departamento de Tecnologías del Medio Ambiente. Tesis Dotoral publicada.
- ©BacLight™., (2004). LIVE/ DEAD ©BacLight™. Bacterial Viability and Counting Kit (L34856). *Molecular Probes*. 1:1-5.
- Becton, D. (1995). Immunocytometry System. FACS training Manual.1:5-6
- Chia-Jung C., Andy Hong P.K. and Cheng-Fang L. (2012). Improved solubilization of activated sludge by ozonation in pressure cycles. *Science Direc*. 87:637–643.
- Chen, G., An, K., Saby S., Brois, E. and Djafer, M. (2003). Possible cause of excess sludge reduction in an oxic-settling-anaerobic activated sludge process (OSA process). *Water Research*. 37:3855-3866.
- Cox, C. D. (2004). Statistical distributions of uncertainty and variability in activated sludge model parameters. *Water Environment Research*. 76, 2672-2685.
- Dold, P., Ekama, G. y Marais, G. (1980). A general model for the activate sludge process. *Progress in WaterTechnology*. 12: 47-77.
- Ekama, G., Dold, P. and Marais, G. (1986). Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge systems. *Water Science and Technology*.18: 91-114.
- Esparza-Soto, M., Hernandez-Nuñez, S. y Fall, C. (2011). Spectrometric characterization of effluent organic matter of a sequencing batch reactor operated at three sludge retention times. *Water Research*. 45: 6555-6563.
- Espinoza-Rodríguez M. A., N. Flores-Álamo, M. Esparza-Soto y C. Fall (2012). Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento y decaimiento heterotrófico en el rango de 20-30 °C en un proceso de lodos activados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Centro Interamericano de Recursos del Agua. Facultad de Ingeniería, Universidad del Estado de México.
- Fabila, D. (2010). Desarrollo de un espectroflorómetro portátil para mediciones in situ de tejido biológico. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de Maestría publicada. México, DF.
- Fall, C. Diaz-Delgado, C. y Chávez, R. (2006). Modelación matemática de plantas de tratamiento de lodos. *Revista Técnica de Medio Ambiente*. 110:32-47.

- Fall, C., Hooijmans, C., Esparza, M., Olguin, M. and Ba, K. (2012). Initial-rate based method for estimating the maximum heterotrophic growth rate parameter (μ_H max). *Bioresource Technology*. 116:126-132.
- Fall, C. (2012) “Reducción de los sólidos generados por el proceso de lodo activado” Notas de curso. Centro Interamericano de Recursos del Agua. UAMEX.
- Foladori, P., Bruni L. and Tamburini S. (2012a). Bacteria permeabilization and disruption caused by sludge reduction technologies evaluated by flow cytometry. *Revista Science Direct*. 44:4888-4899.
- Foladori, P., Bruni L., Tamburini S., Ziglio G. (2012b). Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Revista Science Direct*.44: 3807-3818.
- Friedrich, M., Takács, I., (2013). A new interpretation of endogenous respiration profiles for the evaluation of the endogenous decay rate of heterotrophic biomass in activated sludge. *Water Research*. 47 (15), 5639–5646.
- Hammes, F., Berney M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O. and Egli, T. (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*. 42:269–277.
- Hauduc, H., Rieger, L., Ohtsuki, T., Shaw, A., Tákacs, I., Winkler, S., Héduit, A., Vanrolleghem, P. A. y Gillot, S. (2010). Activated sludge modelling: Development and potential use of a practical applications database. WWTmod2010. *Second Seminary QC Canada*.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T. and Van, L. (2002). Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3. *IAWQ scientific and technical report*. 9:130.
- Li, D., Miao, He. and Sunny. C. (2001). Detection of infectious adenoviruses in environmental waters by fluorescence-activated cell sorting assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 1442–1448.
- Liu and Tay (2003). Chemically reduced excess sludge production in the activated sludge process. *Chemosphere*. 50:1-7.
- Low, E. y Chase, H. (1999). Reducing production of excess biomass during wastewater treatment. *Water Research*.33:1119-1132
- Kappeler, J. y Gujer, W. (1992). Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modeling. *Water Science and Technology*. 25:125-139.
- Martínez-García, C.G., Olguín, M.T., Fall, C., (2014). Aerobic stabilization of biological sludge characterized by an extremely low decay rate: modeling, identifiability analysis and parameter estimation. *Bioresource Technology*. 166:112–119.

- Metcalf & Eddy (2003). Wastewater Engineering, Treatment and Reuse. McGraw-Hill, New York.
- Ni Bing-Jie, Fang Fang, Xie Wen-Ming and Yu Han-Qing. (2008). Growth, maintenance and product formation of autotrophs in activated sludge: Taking the nitrite-oxidizing bacteria as an example. *Water Research* 42: 4261-4270.
- Orfao, A. and Ruiz, A. (1996). General Concepts about Cell Sorting Techniques. *Clinical Biochemistry*. 29(1): 5-9.
- Parks, D. y Herzenberg, L. (1984). Fluorescence-Activated Cell Sorting: Theory, Experimental Optimization, and Applications in Lymphoid Cell Biology. *Methods in Enzymology*. 108: 197-241.
- Pons, M., Bonté, S. and Potier, O. (2004). Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterization. *Journal Biotechnology*. 113:211-230.
- Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. y Scheper T. (2001). Flow Cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 350-360.
- Rodríguez, J. (2010). Estudio comparativo de diferentes Tecnologías de Higenización de lodos de depuradora con fines para su reutilización. Universidad Politécnica de Madrid. Tesis doctoral publicada. Madrid, España.
- Rodríguez, E. M., Flores, A. N., Esparza, S. M. y Fall, C. (2012). Efecto de la temperatura en la tasa de Crecimiento y Decaimiento Heterotrófico en el rango de 20-32°C en un Proceso de Lodos Activados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(2):309 -321.
- Saadi, I., Borisover, M., Armon, R. y Laor, Y., (2006). Monitoring of effluent DOM biodegradation using fluorescence, UV and DOC measurements. *Chemosphere*. 63: 530-539.
- Salgado, L. (2002). Citometría de flujo: Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología. Curso de Métodos en Biotecnología.
- Scheffold, A. y Kern, F. (2000). Recent Developments in Flow Cytometry. *Journal of Clinical Immunology*. 20(6): 400-407.
- Spanjers, H. and P.A. Vanrolleghem, (1995). Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Science Technology* 31(2): 105-114
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P., Olisson, G. y Dold, P. (1996). Respirometry in control of the activated sludge process. *Water Science and Technology*. 34: 117-126.

- Stock, R. (2006). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología “ESPECTROFLUOROMETRÍA”. Universidad Autónoma de México, Instituto de Biotecnología. México.
- Terrones, E. (2009). PARÁMETROS DE OPERACIÓN en el proceso de tratamiento de agua residual por lodos activados.52
- Van. Ha, Catunda, P. and Araujo, L, (1998). Biological sludge stabilisation: Part 1. Kinetics of aerobic sludge digestion. *Water SA* .24 (3): 223–230.
- Vargas, M., Yuan, Z., Pijuan, M., (2013). Effects of long-term starvation conditions on poly-phosphate and glycogen-accumulating organisms. *Bioresource Technology*. 127:126–131.
- Vanrolleghem, P., Spanger, H., Petersen, B., Ginestet, P. y Takács, I.(1999). Estimating (combination of) activated sludge model No. 1 parameters and components by respirometry. *Water Science and Technology*. 39:195-214.
- Ventura-Cruz, s.; Fall, C. Y Esparza-Soto, M. (2014). Caracterización de la materia orgánica en el efluente de un reactor nitrificante utilizando espectroscopia de fluorescencia. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 13(1): 279-289.
- Vitala, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L. y Hammes, F. (2011). Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: Alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Research*. 46:4665-4676.
- Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K . , Verstraete, W. y Boon, N. (2010). Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Rev. Cell Press*. 28:416-424.
- Wentzel, M., Dold, P., Ekama, G. and Marais, R. (1989). Enhanced polyphosphate organism cultures in activated sludge systems. *Part III: kineticodel. Water SA*. 15 (2):89–102.
- Ziglio, G., Andreottola, G., Barbesti G., Bruni, L., Foladori, P. y Villa, R. (2002). Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. *Water Res*. 36(2):460-468.