

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EN FANGOS DE EDAR PARA POTENCIAR LA RECUPERACIÓN DE P

**TESIS DOCTORAL
ADRIANA PACHERRES ATO**

Dirigido por:

**Dr. Alberto Bouzas Blanco
Dra. Laura Pastor Alcañiz**

JUNIO 2025



Programa de Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y de Procesos

JUNIO 2025

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE ENZIMAS
HIDROLÍTICAS EN FANGOS DE EDAR PARA POTENCIAR LA
RECUPERACIÓN DE P**

Autora: Adriana Pacherras Ato

Directores: Alberto Bouzas y Laura Pastor

AGRADECIMIENTOS

Tras 6 años de una intermitente pero nunca olvidada responsabilidad, llego al final de esta etapa de mi vida. Tengo tanto que expresar que no sé si sepa resumirlo en estas líneas, pero lo voy a intentar.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento hacia mis directores de tesis, Alberto y Laura. Alberto, gracias por haber confiado en mí para desarrollar esta línea de investigación. Laura, conforme te incorporaste a ser mi codirectora de tesis, aportaste una visión fresca a esta investigación. Os agradezco a ambos el tiempo dedicado durante todos estos años, sé que os he hecho el camino largo, pero no habéis dejado de estar allí y realmente me habéis ayudado a dar a luz este proyecto.

A modo personal, quiero agradecer a mis padres, Pilar y Oscar. De no ser por vosotros, no habría llegado ni siquiera a estudiar tan lejos del país que me vio nacer, nuestro siempre querido Perú. Habéis hecho una hazaña realmente increíble para con vuestros hijos, en especial para nuestro motor familiar, Carlitos. Os dedico este logro, porque sin vosotros nunca hubiera soñado con llegar tan lejos, gracias por haberme dado las alas y enseñarme que por muy lejos que vuele, la familia siempre estará ahí.

A mi hermano mayor, Oscar, y su familia. Me habéis dado la oportunidad de conocer el amor más puro que he conocido hasta ahora, el de un sobrino o sobrina. Gracias por eso, y gracias a mi hermano en especial, por tener tanta fe en mí, tú supiste siempre que lo lograría.

Ahora, y de forma muy especial, quiero agradecer a mi pareja, compañero de vida y la persona que más me ha acompañado en todo este proceso. Carlos, con tu apoyo y tu cariño constante pude superar numerosas caídas. Cada vez que pasaba, tú me ayudabas a levantarme, más fuerte y valiente. Gracias, porque este camino ha sido una carrera de fondo y hemos llegado a la meta juntos y con un gran aprendizaje.

A mis compañeros de CALAGUA:

Jesús y Patri, veros conseguir esta meta me inspiró muchísimo. Gracias por tantísimas risas en el despacho, porque vuestra compañía siempre fue un punto extra positivo y diario.

Rebecca, de no ser por ti no habría aprendido a moverme por el laboratorio y de digestión anaerobia, campo en el que trabajo actualmente y me encanta. Berta, nos acogiste en ese laboratorio como a otras generaciones de calagüitos, fue breve pero agradezco la paciencia y el apoyo que siempre nos diste. Josué, Pau y Nuria, os conocí cuando ibais de salida, fuisteis junto a Rebecca un gran ejemplo de constancia y profesionalidad.

A mis compañeros de AINIA:

AINIA me ha dado la oportunidad de conocer a grandes personas: Carol, María y Rocío. Os conocí primero a vosotras que a nadie en AINIA, y fue de las mejores cosas que me pasaron. Me habéis dado tantos ánimos para llegar hasta aquí y siempre habéis tenido una sonrisa para darme, cuando muchas veces la he necesitado. Colvée, Silvia, David, Gema, Carlos, Miguel, amics del 25%, que gustazo da trabajar con gente tan profesional y divertida a la vez.

Begoña Ruiz y Pablo López, gracias por todo el apoyo durante esta etapa y por cada palabra de ánimo en los pasillos.

A mis compañeras y amigas, Ivana y Sandra, un especial agradecimiento. Gracias por vuestra compañía cada tarde de “tesis time”, nuestros cafés, nuestras risas y muchos llantos. Me lo habéis hecho más fácil, sin ni siquiera daros cuenta.

Finalmente, a mis amigas, Alba, Michelle, Cristina, Magdalena y más personas que siempre han tenido una buena palabra para darme ánimos. Os estoy muy agradecida, vuelvo recargada de energías para todos esos planes que debían esperar a acabar primero este proyecto que empecé hace unos cuantos años y que ha monopolizado tantas tardes.

RESUMEN

El fósforo (P) es un nutriente esencial e insustituible para el crecimiento vegetal, cuya disponibilidad futura está amenazada por la progresiva escasez de sus fuentes minerales naturales. La creciente preocupación por la seguridad alimentaria y la sostenibilidad ambiental ha impulsado la búsqueda de estrategias para recuperar este elemento clave a partir de residuos generados por los organismos vivos. En este contexto, las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) se perfilan como puntos estratégicos para esta recuperación, al concentrar en sus fangos una fracción significativa del P presente en el agua residual. En este marco se desarrolla la presente tesis doctoral, vinculada al proyecto PHERTILIZER “*Sistema circular para la recuperación y valorización agronómica del fósforo*”, cuyo objetivo es mejorar de forma sostenible los sistemas agronómicos mediante el desarrollo de un nuevo fertilizante a base de estruvita, obtenido a partir de los fangos de EDAR.

El objetivo principal de la investigación ha sido estudiar el potencial de aplicación de enzimas hidrolíticas en fangos de EDAR como estrategia para favorecer la transformación del P orgánico en ortofosfato ($P-PO_4$), forma más fácilmente recuperable y valorizable, así como simular diferentes escenarios de proceso orientados a maximizar la recuperación de este $P-PO_4$ en etapas previas a la digestión anaerobia. El estudio se ha cerrado con un análisis económico detallado de la viabilidad de estos escenarios a escala real.

La aplicabilidad de enzimas hidrolíticas se estudió en ensayos de laboratorio empleando enzimas fitasas y celulolíticas sobre dos tipos de fango: fango secundario y fango mezcla. Las enzimas fitasas actúan en la degradación del ácido fítico, un compuesto de reserva de P en los organismos vegetales, especialmente abundante en los granos de semillas. Debido a que los humanos y otros animales monogástricos no pueden metabolizar eficientemente el ácido fítico, este se excreta sin digerir, representando así una fracción considerable del P total presente en las heces y en las aguas residuales. Por otro lado, las enzimas celulolíticas actúan principalmente degradando el P orgánico contenido en las paredes celulares de los restos vegetales que llegan a la EDAR y se acumulan en los fangos, liberando así el P orgánico asociado a estas estructuras.

Los experimentos realizados con enzimas fitasas sobre fango secundario revelaron que tanto la temperatura como el tiempo de reacción influyen significativamente en la eficacia del proceso, estableciéndose como condiciones operativas óptimas 35°C y 22 h. Los resultados de estos ensayos evidenciaron que la aplicación de dosis enzimáticas por encima de 25 g·kg⁻¹ de fango (b.h) no mejoraba significativamente la liberación de P-PO₄ ni la eficacia del proceso. La aplicación de estas enzimas sobre fango mezcla confirmó la dosis de 25 g·kg⁻¹ de fango (b.h.) como la óptima para promover la liberación de P-PO₄. A partir de este valor, incrementos en la dosis aplicada no generaron mejoras proporcionales en la liberación de P, mientras que dosis inferiores mostraron una reducción clara de eficacia. Así mismo, se observó que el fango mezcla ofrecía mayores concentraciones de P-PO₄ liberadas. Esto se debe a que el fango mezcla parte de un contenido inicial significativamente mayor de P orgánico, lo que proporciona un mayor potencial de liberación. Además, el fango mezcla requiere una menor dosis relativa de enzima por unidad de sólidos totales en base seca, lo que mejora la eficiencia técnica y económica del proceso al optimizar la cantidad de enzimas a utilizar.

Por otra parte, los experimentos realizados con enzimas celulolíticas indicaron la necesidad de aplicar dosis más elevadas, por encima de 50 g enzima·kg⁻¹ de fango (b.h.), con respecto al uso de fitasas, para mostrar una liberación de P-PO₄ significativa.

A pesar de la efectividad de las enzimas fitasas en la extracción de P orgánico, su aplicación en forma libre presentaba ciertas limitaciones, principalmente asociadas a su elevado coste y a la imposibilidad de reutilizar las enzimas. El análisis preliminar de viabilidad económica, realizado a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio, ya apuntaba a que la aplicación de enzimas fitasas en forma libre no sería rentable, algo que fue confirmado con el estudio económico realizado posteriormente. Este hecho reforzó la necesidad de investigar alternativas orientadas a reducir los costes operativos y mejorar la eficacia del proceso. En este contexto, se desarrollaron estudios con fitasas inmovilizadas como estrategia para optimizar la cantidad de enzima a emplear y reducir así los costes operativos. En particular, se realizaron encapsulaciones de fitasa con distintos métodos, evaluando su rendimiento en las condiciones operativas seleccionadas como óptimas previamente. Los resultados indicaron que la eficacia del proceso de inmovilización depende de manera crítica del uso o no uso de un agente de entrecruzamiento (crosslinker), del tipo de crosslinker empleado y del

método de secado aplicado. Las formulaciones más robustas fueron las obtenidas mediante método sol-gel, con secado natural y utilizando tetraetil ortosilicato (TEOS) como crosslinker. Estas destacaron por su mayor eficacia en la liberación de $P-PO_4$, así como por su buena estabilidad estructural y capacidad de reutilización a lo largo de varios ciclos.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos y utilizando el programa DESASS, que tiene implementado el modelo BNMR2, se llevaron a cabo simulaciones para evaluar el impacto de distintos escenarios orientados a maximizar la recuperación de P. Estos escenarios contemplan la aplicación de sistemas de extracción de P previos a la digestión anaerobia que combinan procesos de elutriación y la aplicación de enzimas en determinados escenarios. En los escenarios que contemplaban la adición de enzimas, las simulaciones se realizaron considerando el uso de fitasas en forma libre. De todos los escenarios simulados, la combinación de elutriación de fango mezcla en espesador de gravedad con aplicación de enzimas (Escenario 2) permite alcanzar la mayor eficiencia en la recuperación de P en forma de estruvita (estimada en $27 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$).

El estudio económico detallado de los escenarios planteados mostró que el alto coste de la aplicación de las enzimas en su forma libre hace inviable su uso en condiciones reales, pese a ser técnicamente eficaces. De los cuatro escenarios analizados, los que no incorporan hidrólisis enzimática resultaron viables económicamente, siendo la elutriación de fango mezcla en espesador de gravedad el más favorable en términos de rendimiento por metro cúbico de agua tratada ($0,006 \text{ kg de estruvita}\cdot\text{m}^{-3}$ de agua tratada) y por kilogramo de P afluente ($0,9 \text{ kg de estruvita}\cdot\text{kg}^{-1}$ de P afluente). Sin embargo, este escenario presenta un riesgo potencial de desbordamiento en el espesador primario que debe ser gestionado cuidadosamente. Por su parte, dicho escenario combinado con la adición de enzimas, a pesar de su alta eficiencia en recuperación de P (con un aumento del 74% en producción de estruvita por kilogramo de P afluente y del 47% por metro cúbico de agua tratada), implica un incremento considerable del consumo energético, así como un coste de operativo considerablemente más alto. Estos incrementos se deben principalmente al precio de la enzima y al aumento en el consumo de reactivos para la cristalización de estruvita.

En conclusión, la recuperación de P en EDAR mediante procesos de hidrólisis enzimática presenta un alto potencial técnico, sin embargo, su viabilidad a escala industrial depende en gran medida de factores económicos, como el coste de la enzima y el precio de venta de la estruvita, que actualmente no compensan la inversión requerida. La inmovilización de la enzima, al prolongar su acción en el fango y reducir las cantidades necesarias para su aplicación, emerge como una estrategia prometedora para mejorar la eficiencia y reducir costes. Por tanto, resulta fundamental continuar investigando y optimizando estas técnicas de encapsulación para avanzar hacia una implementación rentable. A pesar de estas limitaciones económicas, la estrategia de inmovilización de las enzimas ofrece claras ventajas ambientales y puede constituir una alternativa valiosa en el futuro, especialmente si se logran reducir los costes asociados o si se establecen incentivos regulatorios que valoren la sostenibilidad del proceso.

RESUM

El fòsfor (P) és un nutrient essencial i insubstituïble per al creixement vegetal, la disponibilitat futura del qual es veu amenaçada per l'escassetat progressiva de les seues fonts minerals naturals. La creixent preocupació per la seguretat alimentària i la sostenibilitat ambiental ha impulsat la recerca d'estratègies per a recuperar aquest element clau a partir de residus generats pels organismes vius. En aquest context, les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) es perfilen com a punts estratègics per a aquesta recuperació, en concentrar en els seus fangs una fracció significativa del P present en l'aigua residual. En aquest marc es desenvolupa la present tesi doctoral, vinculada al projecte PHERTILIZER *"Sistema circular per a la recuperació i valorització agronòmica del fòsfor"*, l'objectiu del qual és millorar de manera sostenible els sistemes agronòmics mitjançant el desenvolupament d'un nou fertilitzant a base d'estruvita, obtingut a partir dels fangs d'EDAR.

L'objectiu principal de la investigació ha sigut estudiar el potencial d'aplicació d'enzims hidrolítics en fangs d'EDAR com a estratègia per a afavorir la transformació del P orgànic en ortofosfat ($P-PO_4$), forma més fàcilment recuperable i valoritzable, així com simular diferents escenaris de procés orientats a maximitzar la recuperació d'aquest $P-PO_4$ en etapes prèvies a la digestió anaeròbia. L'estudi s'ha tancat amb una anàlisi econòmica detallada de la viabilitat d'aquests escenaris a escala real.

L'aplicabilitat d'enzims hidrolítics es va estudiar en assaigs de laboratori emprant enzims fitases i cel·lulolítics sobre dos tipus de fang: fang secundari i fang barreja. Les enzims fitases actuen en la degradació de l'àcid fític, un compost de reserva de P en els organismes vegetals, especialment abundant en els grans de les llavors. A causa que els humans i altres animals monogàstrics no poden metabolitzar eficientment l'àcid fític, aquest s'excreta sense digerir, representant així una fracció considerable del P total present en els excrements i en les aigües residuals. Per altra banda, les enzims cel·lulolítiques actuen principalment degradant el P orgànic contingut en les parets cel·lulars de les restes vegetals que arriben a l'EDAR i s'acumulen en els fangs, alliberant així el P orgànic associat a aquestes estructures.

Els experiments realitzats amb enzims fitases sobre fang secundari van revelar que tant la temperatura com el temps de reacció influeixen significativament en l'eficàcia del procés, establint-se com a condicions operatives òptimes 35°C i 22 h. Els resultats d'aquests assaigs van evidenciar que l'aplicació de dosis enzimàtiques per damunt de 25 g·kg⁻¹ de fang (b.h.) no millorava significativament l'alliberament de P-PO₄ ni l'eficàcia del procés. L'aplicació d'aquestes enzims sobre fang barreja va confirmar la dosi de 25 g·kg⁻¹ de fang (b.h.) com l'òptima per a promoure l'alliberament de P-PO₄. A partir d'aquest valor, els increments en la dosi aplicada no generaven millores proporcionals en l'alliberament de P, mentre que dosis inferiors mostraven una reducció clara de l'eficàcia. Així mateix, es va observar que el fang barreja oferia majors concentracions de P-PO₄ alliberat. Açò és deu al fet que el fang barreja part d'un contingut inicial significativament més alt de P orgànic, la qual cosa proporciona un major potencial d'alliberament. A més, el fang barreja requereix una dosi relativa menor d'enzim per unitat de sòlids totals en base seca, la qual cosa millora l'eficiència tècnica i econòmica del procés en optimitzar la quantitat d'enzims a utilitzar.

Per altra banda, els experiments realitzats amb enzims cel·lulolítics van indicar la necessitat d'aplicar dosis més elevades, per damunt de 50 g enzim·kg⁻¹ de fang (b.h.), respecte a l'ús de fitases, per tal de mostrar un alliberament significatiu de P-PO₄.

Malgrat l'efectivitat de les enzims fitases en l'extracció de P orgànic, la seua aplicació en forma lliure presentava certes limitacions, principalment associades al seu elevat cost i a la impossibilitat de reutilitzar-les. L'anàlisi preliminar de viabilitat econòmica, realitzada a partir dels resultats obtinguts en els assaigs de laboratori, ja apuntava que l'aplicació d'enzims fitases en forma lliure no seria rendible, fet que es va confirmar amb l'estudi econòmic realitzat posteriorment. Aquest fet reforça la necessitat d'investigar alternatives orientades a reduir els costos operatius i millorar l'eficàcia del procés. En aquest context, es van desenvolupar estudis amb fitases immobilitzades com a estratègia per a optimitzar la quantitat d'enzim a emprar i reduir així els costos operatius. En particular, es van realitzar encapsulacions de fitasa amb diferents mètodes, avaluant-ne el rendiment en les condicions operatives seleccionades prèviament com a òptimes. Els resultats van indicar que l'eficàcia del procés d'immobilització depén de manera crítica de l'ús o no d'un agent d'entrecreuament (crosslinker), del tipus emprat i del mètode d'assecat aplicat. Les formulacions més robustes foren les obtingudes

mitjançant mètode sol-gel, amb assecat natural i utilitzant tetraetil ortosilicat (TEOS) com a crosslinker. Aquestes destacaren per la seua major eficàcia en l'alliberament de $P-PO_4$, així com per la seua bona estabilitat estructural i capacitat de reutilització al llarg de diversos cicles.

A partir dels resultats obtinguts en els assaigs enzimàtics i utilitzant el programa DESASS, que té implementat el model BNMR2, es van dur a terme simulacions per a avaluar l'impacte de diferents escenaris orientats a maximitzar la recuperació de P. Aquests escenaris contemplen l'aplicació de sistemes d'extracció de P previs a la digestió anaeròbia que combinen processos d'elutriació i l'aplicació d'enzims en determinats escenaris. En els escenaris que contemplaven l'addició d'enzims, les simulacions es realitzaren considerant l'ús de fitases en forma lliure. De tots els escenaris simulats, la combinació d'elutriació de fang barreja en espesador de gravetat amb aplicació d'enzims (Escenari 2) permet assolir la major eficiència en la recuperació de P en forma d'estruvita (estimada en $27 \text{ kg} \cdot \text{dia}^{-1}$).

L'estudi econòmic detallat dels escenaris plantejats va mostrar que l'elevat cost de l'aplicació d'enzims en la seua forma lliure fa inviable el seu ús en condicions reals, tot i ser tècnicament eficaços. Dels quatre escenaris analitzats, els que no incorporen hidròlisi enzimàtica resultaren viables econòmicament, sent l'elutriació de fang barreja en espesador de gravetat el més favorable en termes de rendiment per metre cúbic d'aigua tractada ($0,006 \text{ kg d'estruvita} \cdot \text{m}^{-3} \text{ d'aigua tractada}$) i per quilogram de P affluent ($0,9 \text{ kg d'estruvita} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ de P affluent}$). No obstant això, aquest escenari presenta un risc potencial de desbordament en l'espessidor primari que ha de ser gestionat amb cura. Per la seua part, aquest escenari combinat amb l'addició d'enzims, tot i la seua alta eficiència en la recuperació de P (amb un augment del 74% en producció d'estruvita per quilogram de P affluent i del 47% per metre cúbic d'aigua tractada), implica un increment considerable del consum energètic, així com un cost operatiu significativament més alt. Aquests increments es deuen principalment al preu de l'enzim i a l'augment en el consum de reactius per a la cristallització de l'estruvita.

En conclusió, la recuperació de P en EDAR mitjançant processos d'hidròlisi enzimàtica presenta un alt potencial tècnic, però la seua viabilitat a escala industrial depén en gran mesura de factors econòmics, com ara el cost de l'enzim i el preu de venda de l'estruvita, que actualment no compensen

la inversió requerida. La immobilització de l'enzim, en prolongar la seua acció en el fang i reduir les quantitats necessàries per a la seua aplicació, emergeix com una estratègia prometedora per a millorar l'eficiència i reduir costos. Per tant, resulta fonamental continuar investigant i optimitzant aquestes tècniques d'encapsulació per a avançar cap a una implementació rendible. Malgrat aquestes limitacions econòmiques, l'estratègia d'immobilització de les enzims ofereix clars avantatges ambientals i pot constituir una alternativa valuosa en el futur, especialment si s'aconsegueixen reduir els costos associats o si s'estableixen incentius reguladors que valoren la sostenibilitat del procés.

SUMMARY

Phosphorus (P) is an essential and irreplaceable nutrient for plant growth, whose future availability is threatened by the progressive scarcity of its natural mineral sources. Growing concern for food security and environmental sustainability has driven the search for strategies to recover this key element from waste generated by living organisms. In this context, wastewater treatment plants (WWTPs) are emerging as strategic points for this recovery, as their sludge concentrates a significant fraction of the P present in wastewater. This doctoral thesis is developed within this framework, linked to the PHERTILIZER project *“Circular system for the recovery and agronomic valorization of phosphorus”*, whose objective is to sustainably improve agronomic systems through the development of a new struvite-based fertilizer obtained from WWTP sludge.

The main objective of the research was to study the potential application of hydrolytic enzymes in WWTP sludge as a strategy to promote the transformation of organic P into orthophosphate (P-PO₄), a more easily recoverable and valuable form, as well as to simulate different process scenarios aimed at maximizing the recovery of this P-PO₄ in stages prior to anaerobic digestion. The study concluded with a detailed economic analysis of the feasibility of these scenarios on a real scale.

The applicability of hydrolytic enzymes was studied in laboratory tests using phytase and cellulolytic enzymes on two types of sludge: secondary sludge and mixed sludge. Phytase enzymes act in the degradation of phytic acid, a P reserve compound in plant organisms, especially abundant in seed grains. Because humans and other monogastric animals cannot efficiently metabolize phytic acid, it is excreted undigested, thus representing a considerable fraction of the total P present in feces and wastewater. On the other hand, cellulolytic enzymes act mainly by degrading the organic P contained in the cell walls of plant debris that reaches the WWTP and accumulates in the sludge, thus releasing the organic P associated with these structures.

Experiments conducted with phytase enzymes on secondary sludge revealed that both temperature and reaction time significantly influence the efficiency of the process, with 35°C and 22 hours being established as optimal operating conditions. The results of these tests showed that the application of enzyme doses above 25 g·kg⁻¹ of sludge (b.h) did not significantly improve the release of P-PO₄ or

the efficiency of the process. The application of these enzymes to mixed sludge confirmed that a dose of $25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of sludge (b.h.) was optimal for promoting the release of P-PO_4 . Above this value, increases in the applied dose did not generate proportional improvements in P release, while lower doses showed a clear reduction in efficacy. Likewise, it was observed that mixed sludge offered higher concentrations of released P-PO_4 . This is because mixed sludge starts with a significantly higher initial organic P content, which provides greater release potential. In addition, mixed sludge requires a lower relative enzyme dose per unit of total solids on a dry basis, which improves the technical and economic efficiency of the process by optimizing the amount of enzymes to be used.

On the other hand, experiments conducted with cellulolytic enzymes indicated the need to apply higher doses, above $50 \text{ g enzyme} \cdot \text{kg}^{-1}$ of sludge (b.h.), compared to the use of phytases, in order to show a significant release of P-PO_4 .

Despite the effectiveness of phytase enzymes in extracting organic P, their application in free form had certain limitations, mainly associated with their high cost and the impossibility of reusing the enzymes. The preliminary economic feasibility analysis, based on the results obtained in the laboratory tests, already indicated that the application of free-form phytase enzymes would not be profitable, which was confirmed by the economic study carried out subsequently. This fact reinforced the need to investigate alternatives aimed at reducing operating costs and improving the efficiency of the process. In this context, studies were carried out with immobilized phytases as a strategy to optimize the amount of enzyme to be used and thus reduce operating costs. In particular, phytase encapsulations were carried out using different methods, evaluating their performance under the operating conditions previously selected as optimal. The results indicated that the effectiveness of the immobilization process depends critically on the use or non-use of a crosslinking agent, the type of crosslinker used, and the drying method applied. The most robust formulations were obtained using the sol-gel method, with natural drying and using tetraethyl orthosilicate (TEOS) as the crosslinker. These stood out for their greater efficiency in the release of P-PO_4 , as well as for their good structural stability and reusability over several cycles.

Based on the results obtained in the enzymatic tests and using the DESASS program, which has implemented the BNMR2 model, simulations were carried out to evaluate the impact of different scenarios aimed at maximizing P recovery. These scenarios consider the application of P extraction systems prior to anaerobic digestion that combine elutriation processes and the application of enzymes in certain scenarios. In the scenarios that included the addition of enzymes, the simulations were carried out considering the use of free-form phytases. Of all the simulated scenarios, the combination of mixed sludge elutriation in a gravity thickener with the application of enzymes (Scenario 2) allows for the highest efficiency in P recovery in the form of struvite (estimated at $27 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$).

The detailed economic study of the scenarios proposed showed that the high cost of applying enzymes in their free form makes their use unfeasible in real conditions, despite being technically effective. Of the four scenarios analyzed, those that do not incorporate enzymatic hydrolysis were economically viable, with mixed sludge elutriation in a gravity thickener being the most favorable in terms of yield per cubic meter of treated water ($0.006 \text{ kg of struvite}\cdot\text{m}^{-3}$ of treated water) and per kilogram of influent P ($0.9 \text{ kg of struvite}\cdot\text{kg}^{-1}$ of P influent). However, this scenario presents a potential risk of overflow in the primary thickener that must be carefully managed. On the other hand, this scenario combined with the addition of enzymes, despite its high efficiency in P recovery (with a 74% increase in struvite production per kilogram of influent P and a 47% increase per cubic meter of treated water), implies a considerable increase in energy consumption, as well as a significantly higher operating cost. These increases are mainly due to the price of the enzyme and the increase in the consumption of reagents for struvite crystallization.

In conclusion, P recovery in WWTPs through enzymatic hydrolysis processes has high technical potential; however, its viability on an industrial scale depends largely on economic factors, such as the cost of the enzyme and the sale price of struvite, which currently do not offset the required investment. Enzyme immobilization, by prolonging its action in the sludge and reducing the quantities required for its application, emerges as a promising strategy for improving efficiency and reducing costs. Therefore, it is essential to continue researching and optimizing these encapsulation techniques in order to move towards cost-effective implementation. Despite these economic

limitations, the enzyme immobilization strategy offers clear environmental advantages and may constitute a valuable alternative in the future, especially if the associated costs can be reduced or if regulatory incentives are established that value the sustainability of the process.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. FUENTE NO RENOVABLE Y EN VÍAS DE AGOTAMIENTO	13
1.2. DE CONTAMINANTE A RECURSO.....	15
1.2.1. FORMAS DEL P EN LOS FANGOS DE EDAR.....	17
1.2.1.1. ÁCIDO FÍTICO COMO P ORGÁNICO.....	20
1.2.1.2. P ORGÁNICO ASOCIADO A RESTOS VEGETALES	24
1.2.2. TRATAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES.....	25
1.2.2.1. TRATAMIENTO DE LA LÍNEA DE AGUAS.....	25
1.2.2.2. TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS	26
1.2.2.3. ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DEL AGUA RESIDUAL	28
1.2.2.3.1. ELIMINACIÓN DE N	28
1.2.2.3.2. ELIMINACIÓN DE P.....	29
1.2.2.3.3. ELIMINACIÓN BIOLÓGICA SIMULTÁNEA DE NUTRIENTES	33
1.2.2.4. TRATAMIENTO DE LA LÍNEA DE FANGOS	35
1.2.2.4.1. DIGESTIÓN ANAEROBIA	36
1.2.2.5. RECUPERACIÓN DE P EN FORMA DE ESTRUVITA COMO FERTILIZANTE	40
1.2.3. RECUPERACIÓN DEL P EN UNA EDAR.....	42
1.2.3.1. SOLUCIONES PARA LOS PROBLEMAS DE PRECIPITACIÓN DE P EN EL INTERIOR DE LOS DIGESTORES ANAEROBIOS	43
1.2.3.1.1. ELUTRIACIÓN DE FANGO DE EDAR PARA LA POSTERIOR RECUPERACIÓN DEL P INORGÁNICO EN FORMA DE ESTRUVITA	43
1.2.3.1.2. COMBINACIÓN DE SISTEMAS DE ELUTRIACIÓN Y RECUPERACIÓN DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE P DE LOS FANGOS DE EDAR.....	49
1.2.3.2. PRETRATAMIENTOS APLICADOS A LOS FANGOS DE EDAR	50
1.2.3.3. ENZIMAS HIDROLÍTICAS.....	53
1.2.3.3.1. ENZIMAS FOSFATASAS.....	55
1.2.3.3.2. ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	59
1.2.3.4. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	60
1.2.3.4.1. ENCAPSULACIÓN DE ENZIMAS CON BASE EN CITOSANO	62
1.2.3.4.2. ENZIMAS ENCAPSULADAS EN HIDROGELES.....	67
1.2.4. LEGISLACIÓN EUROPEA	69
1.2.4.1. P COMO UN RECURSO A SER RECUPERADO DE LAS AGUAS RESIDUALES	69
1.2.4.2. P COMO UN PRODUCTO RECUPERADO.....	70

1.2.4.3.	APLICACIÓN DEL P RECUPERADO EN EL SUELO EN AGRICULTURA	75
2.	OBJETIVOS	80
3.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	84
3.1.	DESCRIPCIÓN DE LA EDAR DE CALAHORRA	84
3.2.	SUSTRATOS.....	86
3.3.	ENZIMAS HIDROLÍTICAS	88
3.3.1.	ENZIMAS FITASAS.....	88
3.3.2.	ENZIMAS CELULOLÍTICAS	88
3.4.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO.....	89
3.4.1.	MÉTODO COLORIMÉTRICO	90
3.4.2.	MÉTODO POR HPLC.....	91
3.5.	ENSAYO DE REFERENCIA CON SUSTRATO PATRÓN DE ÁCIDO FÍTICO	92
3.6.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FITASA.....	93
3.7.	ENSAYOS ENZIMÁTICOS	94
3.7.1.	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS OPERACIONALES DE LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	97
3.7.2.	CÁLCULOS.....	105
3.7.3.	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	107
3.8.	ESTUDIO DEL POTENCIAL DE BIOMETANIZACIÓN TRAS LA ADICIÓN DE ENZIMA	110
3.9.	ENCAPSULACIÓN ENZIMÁTICA.....	113
3.9.1.	MÉTODO SOL-GEL	113
3.9.2.	MÉTODO SPRAY-DRYING.....	118
3.9.3.	MÉTODO POLIMERIZACIÓN EN MASA	121
3.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	124
3.11.	SIMULACIÓN DEL PROCESO	126
3.12.	ANÁLISIS ECONÓMICO	134
4.	RESULTADOS.....	141
4.1.	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE OPERACIÓN PARA LA LIBERACIÓN DE P MEDIANTE ENZIMAS HIDROLÍTICAS.....	142
4.1.1.	CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO FÍTICO EN EL SUSTRATO DE ESTUDIO	142
4.1.2.	ENSAYO DE REFERENCIA CON SUSTRATO PATRÓN DE ÁCIDO FÍTICO	143
4.1.3.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS FITASAS...	144

4.1.4.	LOTE DE ENSAYOS “S”: ENZIMAS FITASAS APLICADAS SOBRE FANGO SECUNDARIO	145
4.1.5.	LOTE DE ENSAYOS “M”: ENZIMAS FITASAS APLICADAS SOBRE FANGO MEZCLA	171
4.1.5.1.	ESTUDIO DEL POTENCIAL DE BIOMETANIZACIÓN TRAS ENSAYO ENZIMÁTICO	198
4.1.6.	COMPARATIVA INTEREXPERIMENTAL EN FUNCIÓN DEL SUSTRATO ENSAYADO: FANGO SECUNDARIO Y FANGO MEZCLA.....	202
4.1.7.	LOTE DE ENSAYOS “C”: ENZIMAS CELULOLÍTICAS APLICADAS SOBRE FANGO MEZCLA	206
4.1.8.	COMPARATIVA ENTRE ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y FITASAS.....	212
4.1.9.	LOTE DE ENSAYOS “I”: ENSAYOS CON ENZIMAS FITASA ENCAPSULADAS	213
4.1.9.1.	MÉTODO SOL-GEL.....	216
4.1.9.2.	MÉTODO SPRAY-DRYING	230
4.1.9.3.	MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN EN MASA	246
4.1.9.4.	COMPARATIVA DE LAS DISTINTAS ENCAPSULACIONES REALIZADAS.....	253
4.2.	SIMULACIÓN DEL PROCESO	255
4.2.1.	RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO BNRM2	255
4.2.1.1.	CALIBRACIÓN DEL MODELO BNRM2	255
4.1.1.1.	VALIDACIÓN DEL MODELO BNRM2	266
4.2.2.	SIMULACIÓN DE LOS ESCENARIOS ALTERNATIVOS PARA LA RECUPERACIÓN DE P	272
4.2.2.1.	ESCENARIOS SIN HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	274
4.2.2.1.1.	ESCENARIO 0.....	274
4.2.2.1.2.	ESCENARIO 1.....	285
4.2.2.1.3.	COMPARATIVA ESCENARIO 0 Y ESCENARIO 1	292
4.2.2.2.	ESCENARIOS CON HIDRÓLISIS ENZIMÁTICAS	293
4.2.2.2.1.	ESCENARIO 2.....	294
4.2.2.2.2.	ESCENARIO 3.....	301
4.2.2.2.3.	COMPARATIVA ESCENARIO 2 Y ESCENARIO 3	307
4.2.2.3.	COMPARATIVA DE LAS SIMULACIONES REALIZADAS	308
4.3.	ANÁLISIS ECONÓMICO	311
4.3.1.	EVALUACIÓN DE CONSUMOS Y PRODUCCIONES DE LOS DISTINTOS ESCENARIOS PARA LA RECUPERACIÓN DE P	313

4.3.2.	ANÁLISIS ECONÓMICO DE LOS DISTINTOS ESCENARIOS PARA LA RECUPERACIÓN DE P	320
5.	CONCLUSIONES	328
6.	BIBLIOGRAFÍA	338
7.	ANEJOS	362
7.1.	CALIBRACIÓN DEL MODELO BNRM2.....	362
7.1.1.	DECANTACIÓN PRIMARIA	362
7.1.2.	FANGOS ACTIVADOS	364
7.1.3.	ESPESADOR DE FANGO PRIMARIO	365
7.1.4.	ESPESADOR DE FANGO SECUNDARIO	367
7.1.5.	CÁMARA DE MEZCLA.....	368
7.1.6.	DESHIDRATACIÓN DE FANGO	371
7.2.	VALIDACIÓN DEL MODELO BNRM2.....	371
7.2.1.	DECANTACIÓN PRIMARIA	371
7.2.2.	FANGOS ACTIVADOS	373
7.2.3.	ESPESADOR DE FANGO PRIMARIO	374
7.2.4.	ESPESADOR DE FANGO SECUNDARIO	376
7.2.5.	CÁMARA DE MEZCLA.....	377
7.2.6.	DESHIDRATACIÓN DE FANGO	380
7.3.	CAUDALES MÁSICOS, CONCENTRACIONES Y RELACIONES MOLATES DE LOS ESCENARIOS SIMULADOS.....	381
7.3.1.	ESCENARIO 0	381
7.3.2.	ESCENARIO 1	384
7.3.3.	ESCENARIO 2	387
7.3.4.	ESCENARIO 3	390
7.4.	FICHA TÉCNICA ENZIMAS HIDROLÍTICAS.....	393
7.4.1.	ENZIMAS FITASA (CASA COMERCIAL ASA ENZYME).....	393
7.4.2.	ENZIMAS CELULOLÍTICAS (CASA COMERCIAL SIGMA ALDRICH - MERK).....	396
7.5.	ABREVIATURAS.....	397

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) está ampliamente extendido en la superficie de la tierra, en las rocas, en el suelo, en el agua y en los seres vivos. Así mismo, es el nutriente más limitante para las algas y las bacterias en la mayoría de los ecosistemas de agua dulce, mientras que el nitrógeno (N) suele ser el más limitante en los ecosistemas marinos costeros (Lal, 2016). Por lo tanto, cuando el P se vuelve más abundante en lagos, arroyos y ríos, las poblaciones de algas pueden crecer rápidamente para formar floraciones de algas.

Una de las principales consecuencias para el medio ambiente provocada por la contaminación de las aguas es el problema de la **eutrofización**. Esta se define como el aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de N y/o P. Esto provoca un crecimiento acelerado de algas y especies vegetales superiores, resultando en trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua afectada. El abundante crecimiento de algas y bacterias también agota la biodiversidad al reducir las concentraciones de oxígeno a niveles anóxicos y al alterar físicamente la estructura del hábitat (Stevenson, 2013).

Así pues, el exceso de P hace que las aguas sean propensas a un crecimiento extraordinario del fitoplancton. La eutrofización resultante afecta negativamente a la capacidad de una masa de agua para servir como suministro de agua potable, recurso recreativo o pesquería, ya que acaba provocando color, olor, turbidez, pérdida de oxígeno disuelto y eliminación del hábitat de los peces (United States Environmental Protection Agency, 1995). La eutrofización conlleva costes significativos no solo para la salud humana y el medio ambiente, sino también en términos económicos.

En España, este fenómeno ha sido observado en embalses, lagos y cursos fluviales, especialmente en zonas agrícolas intensivas y áreas urbanas con insuficiente tratamiento de aguas residuales. La eutrofización provoca pérdida de calidad del agua, generación de olores, coloraciones anómalas, disminución de oxígeno disuelto y mortandades de peces, lo que compromete los usos recreativos, abastecimiento de agua potable y la biodiversidad acuática (Ministerio de Agricultura, 2015).

Además del deterioro ambiental y los riesgos sanitarios, la eutrofización tiene importantes implicaciones económicas. Según estimaciones del proyecto europeo RECARE (European Commission, 2018), los costes asociados al tratamiento adicional del agua, la pérdida de productividad pesquera y los efectos en el turismo pueden ser significativos. En el caso de la cuenca del Ebro, por ejemplo, se han identificado episodios recurrentes de eutrofización en embalses como el de Barasona o Mequinenza, generando costes adicionales para los sistemas de tratamiento y pérdidas en actividades recreativas (Confederación Hidrográfica del Ebro, 2023).

La nueva Directiva UE 2024/3019 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2024), sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, establece límites más estrictos para la concentración de P en las aguas que desembocan directamente en lagos o embalses, con el objetivo de prevenir la eutrofización.

Según esta directiva, se deben aplicar tratamientos terciarios para eliminar nutrientes como el P en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) de las aglomeraciones urbanas. Los límites establecidos son los siguientes:

- Para plantas grandes (más de 150.000 habitantes equivalentes): $0,5 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$.
- Para plantas medianas (entre 10.000 y 150.000 habitantes equivalentes): $0,7 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$.

Además, la directiva establece que las zonas sensibles a la eutrofización, como los lagos y embalses con escaso intercambio de aguas, deben ser objeto de especial atención. En estas zonas, se recomienda la eliminación del P a menos que se demuestre que dicha eliminación no tendrá consecuencias sobre el nivel de eutrofización.

En resumen, la nueva directiva europea establece límites más estrictos para la concentración de P en las aguas que desembocan en lagos o embalses, con el fin de prevenir la eutrofización y proteger la calidad de las masas de agua.

Las fuentes de P en las aguas superficiales son variadas. En concreto, en el caso de las aguas residuales urbanas, se observan elevadas concentraciones de P como resultado de los excrementos humanos (30%-50% del P viene con aguas residenciales) y del uso generalizado de detergentes sintéticos (50-70%) que contienen componentes de polifosfato (Correll, 1999). Se estiman en 0,3-0,4 kg P/persona/año en la orina más 0,18-0,2 kg P/persona/año en las heces, más una estimación de 0,18 kg P/persona/año procedentes de detergentes y otros productos de limpieza domésticos. Es decir, en total 0,66-0,78 kg P/persona/año (Balmér, 2004).

Las formas más comunes de P presentes en las aguas residuales son los compuestos inorgánicos, es decir, ortofosfatos ($P-PO_4$) y polifosfatos. El resto del P se encuentra formando parte de compuestos orgánicos (Ruzhitskaya & Gogina, 2017).

Por su parte, en el sector agropecuario la aportación de P es debida a que los agricultores aplican P a la tierra en las siguientes formas: fertilizante mineral, estiércol ganadero y/o fangos de EDAR. El objetivo de la aplicación de fertilizantes es aumentar el rendimiento de los cultivos. La aplicación de estiércol puede estar motivada por uno o dos objetivos: aumentar el rendimiento de los cultivos y/o eliminar los desechos de las operaciones ganaderas. Donde el P del suelo es deficiente, cualquiera de las formas de P puede aumentar los rendimientos, pero cuando las reservas de P del suelo superan las necesidades del cultivo, no se producirá un aumento del rendimiento. Así, el P se puede acumular en los suelos agrícolas cuando la tasa de aplicación excede la absorción de la planta (Brady, 2002). La contaminación por fertilizantes, y en particular por P, se produce cuando se utilizan en mayor cantidad de la que pueden absorber los cultivos, o cuando se eliminan por acción del agua antes de que puedan ser absorbidos. Los excesos de N y P pueden infiltrarse en las aguas subterráneas o ser arrastrados a cursos de agua.

El P es considerado el segundo macronutriente más importante después del N para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este elemento se ve involucrado en procesos metabólicos importantes como la producción de energía, fotosíntesis, glicólisis, respiración, activación y desactivación de enzimas, reacciones de óxido-reducción, metabolismo de los carbohidratos, y fijación de N. Además, es un elemento estructural de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos de las membranas. Por todo

ello es considerado un factor limitante para la producción agrícola (Fageria et al., 2013), especialmente en los cultivos de cereales (Woodley, 2014).

Según diversos autores (Ibrahim et al., 2022; Kvakić et al., 2018; Zhu et al., 2018) en más del 30% de las tierras agrícolas del mundo, el rendimiento agrícola está limitado por la falta de P en el suelo. Según lo descrito por (Kirkby & Johnston, 2008), la agricultura intensiva requiere entre 20-35 kg de P por hectárea (ha) y aunque esta cantidad sea aplicada como fertilizante, una mínima parte (raramente más del 25%) es aprovechado por los cultivos (Syers, 2008). La mayor parte del P se pierde por el camino, y esas pérdidas a menudo causan graves problemas medioambientales (Selman, 2007). Esto es debido a que gran parte del P aplicado se fija en el suelo, reduciéndose drásticamente su disponibilidad para el cultivo. Estas reacciones de fijación son básicamente mecanismos de adsorción y precipitación y hacen que sólo una mínima parte del P total presente en el suelo sea aprovechada por las plantas (Delgado & Scalenghe, 2008). El P en el suelo puede estar en forma orgánica o inorgánica. Ambas pueden estar en la disolución del suelo o asociadas a partículas minerales o a compuestos orgánicos del suelo. El P inorgánico normalmente se encuentra en forma de $P-PO_4$, que es la única forma de P que utilizan fácilmente la mayoría de las plantas y los microorganismos.

Por su parte, para que el P orgánico pueda ser utilizado por la planta, debe ser mineralizado y transformado a P inorgánico. Se ha descrito que el porcentaje de P total en el suelo que corresponde a formas orgánicas varía habitualmente entre un 20 y un 80%. El P orgánico está asociado a la materia orgánica básicamente como ésteres del $P-PO_4$ (Saavedra & Delgado, 2005). Las principales formas de fosfatos orgánicos son ésteres del $P-PO_4$, básicamente monoésteres o diésteres, siendo ácido fítico (inositol-6-fosfato) la forma química quizás más abundante en los suelos, principalmente en semillas, granos y vegetales (Turner et al., 2002, 2003). Para poder transformar el P orgánico en P inorgánico, y ponerlo así disponible para su uso, es necesaria la rotura de enlaces éster. Este es un proceso de hidrólisis enzimática realizado por enzimas fosfatasas, que pueden ser de origen microbiano o vegetal.

El P también es un componente importante en la dieta humana debido a que, además de intervenir en la formación y estructura de los huesos, cumple un papel importante en la forma como el cuerpo usa los carbohidratos y las grasas. También es necesario para que el cuerpo produzca proteína para el crecimiento, conservación y reparación de células y tejidos. Asimismo, el P ayuda al cuerpo a producir ATP, una molécula empleada para almacenar energía. Sin embargo, todo el P disponible en la dieta humana proviene de plantas y de animales que consumen esas plantas.

En cuanto a la alimentación animal, los piensos a base de maíz y soja utilizados poseen altas concentraciones de ácido fítico y normalmente necesitan complementarse con fitasas o directamente con P para satisfacer las necesidades del ganado (Beavers, 2014). Generalmente se considera que el P de origen vegetal, principalmente ácido fítico, está poco disponible para su utilización por los animales monogástricos, como el caso del hombre, el cerdo o los peces entre otros (Humer et al., 2015a). Debido a la presencia de ácido fítico en las heces, estos animales también liberan altos niveles de P al medio ambiente, lo que contribuye a la contaminación del agua por eutrofización (Ferris et al., 2010).

El esquema de la Figura 1 ilustra los flujos antropogénicos de P y su distribución en la producción mundial de alimentos. Aproximadamente el 80% del P extraído ($16,5 \pm 3$ millones de toneladas métricas/año) se utiliza como fertilizante para la producción mundial de alimentos, y casi el 35% ($6,3 \pm 3$ millones de toneladas métricas/año) de ese P llega a las aguas superficiales (Cordell et al., 2009). Este P puede entrar en los arroyos como escorrentía no puntual procedente de tierras urbanas y agrícolas y fuentes puntuales como las instalaciones de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales (Bravo et al., 2019) (United States Environmental Protection Agency, 1998).

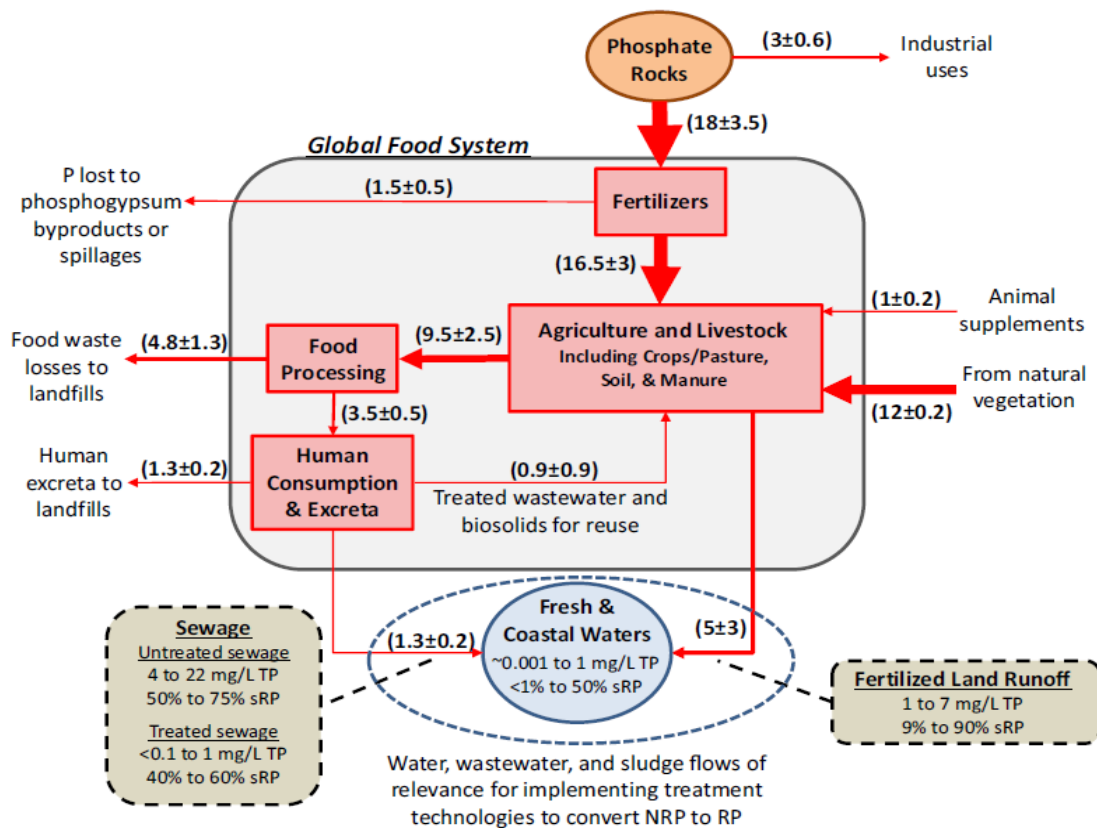


Figura 1. Flujos antropogénicos del P en el caso de la producción mundial de alimentos (Fuente: Venkiteshwaran et al., 2018).¹

1.1. FUENTE NO RENOVABLE Y EN VÍAS DE AGOTAMIENTO

El P es un recurso fundamental para la agricultura, pero su disponibilidad futura está en riesgo debido a su carácter no renovable y su explotación intensiva. Se estima que, con los niveles actuales de consumo, la demanda mundial superará la oferta hacia 2040 (Nedelciu et al., 2020), lo que marcaría el llamado *Peak P*. Desde la introducción de fertilizantes fosfatados hace 160 años, su uso ha aumentado progresivamente, reduciendo considerablemente las reservas globales y generando

¹ El fósforo total se compone de **P reactivo (RP)** y **P no reactivo (NRP)**, cada uno con fracciones **solubles** y **particuladas**.

- **RP:** forma más fácilmente disponible para reacciones químicas.
 - **sRP (soluble)** suele ser predominante en muchas aguas.
- **NRP:** debe transformarse en RP para reaccionar.
 - Común en aguas residuales, fangos, escorrentías y aguas ambientales. Más difícil de eliminar y no directamente recuperable.

previsiones de aumentos sostenidos en el precio de los fertilizantes y de los alimentos (Langhans et al., 2021).

Además del agotamiento, la concentración geográfica de las reservas agrava el problema: el 90 % se encuentra en solo cinco países —Marruecos, China, Argelia, Siria y Sudáfrica—, lo que genera vulnerabilidades en regiones con balanza fosfática negativa como Europa, Asia meridional o América Latina (Nedelciu et al., 2020).

Con una población mundial proyectada de 9.000 millones para 2050 (Alexandratos, 2012), se espera un aumento del 66 % en la demanda de fertilizantes respecto al periodo 2005–2007 (Alexandratos, 2012; Cordell et al., 2009). Según la *Iniciativa Mundial de Investigación del Fósforo*, los sistemas agrícolas actuales dependen de aportes continuos de P extraído de roca fosfórica, un recurso insustituible que podría agotarse este siglo. Recientemente, algunos investigadores supusieron que, basándose en modelos de ciclo de vida de la curva de Hubbert en forma de U, el P se convertirá en un bien escaso y que " las reservas globales pueden agotarse en 50 a 100 años" (Cordell et al., 2009).

Los países que carecen de depósitos de P dependen totalmente de las importaciones y son vulnerables a las fluctuaciones del mercado en los precios de los fertilizantes para garantizar su producción y seguridad alimentaria. Al aumentar la demanda de P los precios subirán y los costes de producción de fertilizante fosfatado también. Además, el progresivo agotamiento de reservas implicará el uso de fuentes de menor calidad, lo que incrementará aún más los costos de extracción y producción.

En conclusión, la limitada disponibilidad de P, su distribución desigual y el aumento de la demanda plantean serios desafíos para la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y la seguridad alimentaria global.

1.2. DE CONTAMINANTE A RECURSO

Una solución sostenible a largo plazo para abordar el doble problema de la escasez de P mineral y la eutrofización basada en este recuperarlo a partir de las corrientes de aguas residuales para su reutilización como fertilizante agrícola. Los investigadores han identificado una amplia gama de tecnologías físicas, térmicas, químicas y biológicas innovadoras para eliminar y recuperar el P (Mehta et al., 2015; B. E. Rittmann et al., 2011). Sin embargo, los procesos existentes pueden tener dificultades para alcanzar de forma consistente estándares de P total (P_T) cada vez más bajos (Neethling et al., 2010; Ragsdale, 2007; Stephens et al., 2004). Un factor clave que contribuye a esta dificultad es que los procesos existentes no pueden eliminar todas las fracciones de P (Gu et al., 2011; Hertzner, 2010). En particular, el P orgánico supone un reto para la eliminación y recuperación del P.

Como se ha mencionado anteriormente, el P está sujeto a normativas cada vez más estrictas y la consecución de niveles más bajos de P en las EDAR, relacionadas con actividades agroindustriales y urbanas, se ha convertido en un reto tecnológico. Para utilizar los recursos limitados (como el P) de manera eficiente, se pueden utilizar procesos para recuperar y reciclar los nutrientes presentes en las aguas residuales y devolverlos al suelo, mejorando posteriormente la producción agrícola.

El circuito de nutrientes involucra la producción agrícola, el procesamiento, el consumo y la recolección/tratamiento de desechos, incluidas las aguas residuales. Por lo tanto, si se recuperan los nutrientes de estas últimas, pueden regresar como valiosos compuestos orgánicos y minerales a la agricultura, cerrando el círculo (McConville et al., 2015). En este sentido, las **aguas residuales industriales y municipales** se consideran **fuentes renovables de P**, de las cuales es posible recuperar dicho nutriente. Las aguas residuales agroindustriales suelen caracterizarse por su alto contenido en P (Taddeo et al., 2018) con concentraciones de P de hasta $3,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Noukeu et al., 2016). En el caso de las aguas residuales urbanas, la concentración media de P total suele oscilar entre 6 y $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (B. E. ; M. P. L. Rittmann, 2012).

Se han dedicado numerosos estudios y patentes al desarrollo de tratamientos y procesos para eliminar y/o recuperar el P de las aguas residuales urbanas e industriales (Desmidt et al., 2015), lo que ha supuesto importantes avances en este tema en los últimos años. Algunas tecnologías ya se

han implantado en las EDAR y actualmente se están optimizando, mientras que muchas solo se han probado en reactores de laboratorio o en instalaciones a escala piloto.

El P se recupera normalmente de las aguas residuales mediante la precipitación de fosfato cálcico, por ejemplo, hidroxiapatita, o fosfato magnésico, por ejemplo, estruvita; y puede recuperarse tanto de **corrientes líquidas** (aguas residuales) como **sólidas** (fangos de depuradora) (Carrillo et al., 2020). En términos aproximados, las eficiencias de recuperación alcanzables oscilan entre el 10% y el 40% cuando se tratan aguas residuales. Sin embargo, estos valores aumentan entre el 40% y el 90% cuando se tratan fangos de depuradora, y se encuentran por encima del 60-100% en el caso de cenizas de fangos de depuradora (Cieřlik & Konieczka, 2017; Desmidt et al., 2015; Egle et al., 2016).

En la actualidad, la mayoría de las tecnologías para la recuperación de P a gran escala se centran en el tratamiento de corrientes líquidas, como aguas residuales, sobrenadante del digestor y efluentes de tratamiento secundario, representando un 59% de aplicación. Le siguen los fangos de depuradora, con un 31%, y las cenizas de fangos de depuradora con un 10% (Carrillo et al., 2024).

Dado que una fracción significativa del P presente en las aguas residuales proviene de los desechos humanos, su recuperación a partir de fangos de depuradora cobra especial relevancia. A nivel mundial, se estima que el P excretado en heces y orina podría cubrir hasta el 22 % de la demanda total de P (Mihelcic et al., 2011). En este contexto, los fangos procedentes de EDAR urbana contienen una cantidad importante de P, lo que los convierte en una reserva potencialmente valiosa para la recuperación de compuestos de este elemento.

1.2.1. FORMAS DEL P EN LOS FANGOS DE EDAR

El P presente en las aguas residuales, y por ende posteriormente en los fangos de EDAR, puede dividirse en las siguientes fracciones (Ec. 1) (Henze, 2000):

$$P_T = S_{PO_4} + S_{P-P} + S_{ORG-P} + X_{ORG-P} \quad (Ec. 1)$$

Donde:

- P_T : P total;
- S_{PO_4} : P- PO_4 (P inorgánico y disuelto);
- S_{P-P} : P polifosfato (P inorgánico y disuelto);
- S_{ORG-P} : P orgánico disuelto;
- X_{ORG-P} : P orgánico suspendido.

Los ortofosfatos (S_{PO_4}) son la única forma de P que la mayoría de las plantas y microorganismos utilizan fácilmente (Crites, 1998) y suelen encontrarse como fosfato simple (PO_4^{3-}) y sus formas protonadas: HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$ o H_3PO_4 , según el pH. Por su parte, los polifosfatos (S_{P-P}) (moléculas con 2 o más átomos de P, como el pirofosfato) deben someterse a hidrólisis antes de sufrir una mayor descomposición biológica (Tchobanoglous, 2003).

En cuanto al P orgánico (X_{ORG-P} y S_{ORG-P}), (Le Corre et al., 2009) indican que la **fracción orgánica** puede llegar a representar hasta el **60% del P_T en los fangos de EDAR**.

En el estudio realizado por (Q. Wang et al., 2022), se realizó un análisis exhaustivo de las formas de P presentes en los fangos procedentes de tres EDAR:

1. **EDAR Ejby Mølle**: emplea un proceso de precipitación química basado en Fe junto con EBPR.
 2. **EDAR de Billund**: similar a la EDAR Ejby Mølle, pero está equipada con un proceso Exelys™ en el que la hidrólisis térmica de los fangos mejora la recuperación de energía.
 3. **EDAR de Esberg**: similar a la EDAR Ejby Mølle, pero realiza una co-dosificación de hierro y aluminio.
-

De estas 3 depuradoras, interesan en concreto los resultados obtenidos para la EDAR Ejby Mølle. Esto es debido a que su configuración (ver Figura 2) resulta interesante en el contexto de la presente tesis, al incorporar un proceso EBPR, un proceso de concentración de los fangos mixtos y un proceso de digestión anaerobia de estos fangos.

Se muestrearon los fangos procedentes del tratamiento primario, secundario, el fango concentrado (previo a la digestión anaerobia), el fango digerido y el fango final (tras dosificación de hierro y deshidratación con adición de polímero). Sobre estas muestras se pretendía analizar la especiación del P a lo largo de todo el proceso en la EDAR (ver Figura 3).

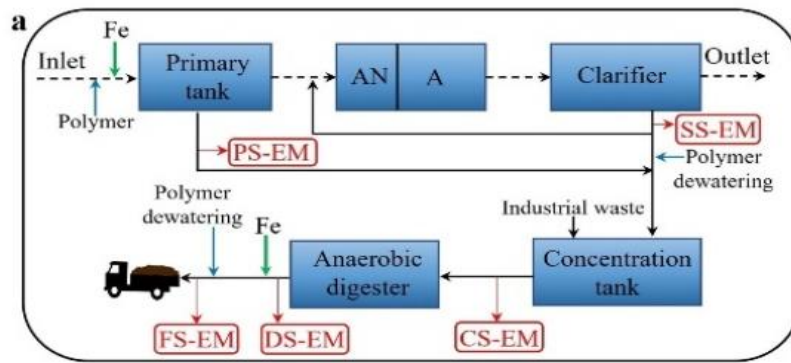


Figura 2. Esquema de los procesos principales en la EDAR Ejby Mølle. AN: anaerobic zone, A: aerobic zone, PS: primary sludge, SS: secondary sludge, CS: sludge from concentration tank, DS: digested sludge, FS: final sludge (Fuente: Wang et al., 2022).

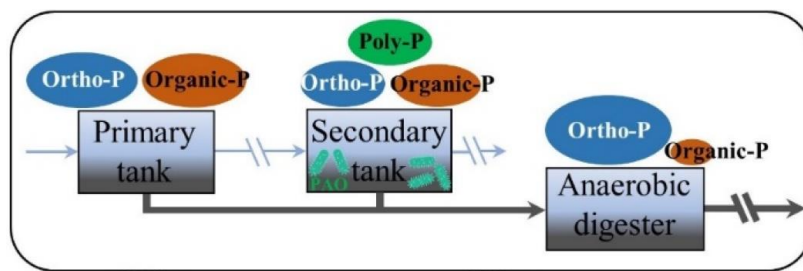


Figura 3. Formas del P en los distintos puntos de la EDAR. Bio-P (P orgánico y Poly-P) y fosfato inorgánico (orto-P. (Fuente: Wang et al., 2022).

En la Figura 4 se presenta el análisis realizado sobre la especiación del P en el caso de la EDAR Ejby Mølle. Así, en cuanto al **fango primario** analizado, se observaron cantidades similares de fosfato inorgánico (53-60% del P_T) y de **P orgánico (37-45%)**. Por su parte, en el caso del **fango secundario**

se observó una presencia significativa de polifosfatos (Poly-P) (44%). Esto es debido al proceso EBPR en el que las bacterias acumuladoras de polifosfatos (PAO) almacenan en su interior el fosfato en forma de Poly-P.

En el caso del **fango digerido** puede observarse que el ortofosfato (Ortho-P) se convirtió en el P predominante (90-98%), mientras que solo pequeñas cantidades de P orgánico (2-9%, principalmente monoésteres de fosfato) permanecieron después de la digestión anaerobia de la mezcla de fangos primarios y secundarios. Por lo tanto, la **digestión anaerobia condujo a la degradación del P orgánico** y a la liberación de P de las células microbianas como orto-P, a partir de la degradación de Poli-P.

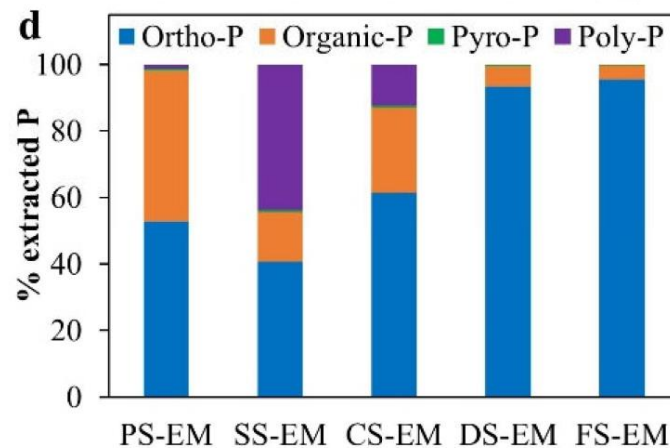


Figura 4. Especiación del P durante un proceso de tratamiento en EDAR. PS: primary sludge; SS: secondary sludge; CS: concentrated sludge; DS: digested sludge; PF: final sludge; EM: Ejby Mølle EDAR.

Según (B. Yu et al., 2021), **en los fangos activados de EDAR, el P orgánico representa entre el 20 % y el 40 % del P_T** , aunque algunas estimaciones indican que puede alcanzar hasta el 60 % (Le Corre et al., 2009). hasta un 60% según indica Este P está compuesto principalmente por monoésteres de $P-PO_4$, diésteres de $P-PO_4$, polifosfatos orgánicos y fosfonatos (Baldwin, 2013).

Por último, (Marti et al., 2008) estudió la precipitación de P en una planta piloto de digestión anaerobia alimentada con un 51% de fango primario pre-fermentado (PPS) y un 49% de fango

biológico procedente de un proceso EBPR. Los resultados obtenidos mostraron que un 58% del P precipitó en forma de estruvita. Se calcula que un 36% del P_T que entra al proceso de DA está asociado a la materia orgánica. A partir de estimaciones realizadas en este estudio, se hace un balance de materia a los distintos componentes de interés. Se observa que **el P orgánico que se libera se corresponde con un 43% del P_T que se libera en el reactor**, estando el 57 % restante asociado al P liberado por el polifosfato de las bacterias PAO.

En vista de la bibliografía consultada, se puede concluir que el P orgánico constituye una fracción significativa del P_T en los fangos de EDAR, variando entre el 20% y el 60%. Este no es fácilmente reactivo y primero debe convertirse en P reactivo ($P-PO_4$) antes de que puedan realizarse las reacciones químicas y se puedan implementar estrategias de recuperación de P (B. E. Rittmann et al., 2011b). En los fangos activados se encuentran diversas especies de P orgánico, principalmente asociadas a componentes celulares como ADN, ARN, trifosfato, difosfato y monofosfato de adenosina, monoésteres y diésteres de fosfato, así como fosfolípidos (Ahlgren et al., 2011; L. Wang et al., 2019). Estos compuestos provienen en su mayoría de metabolitos intracelulares y de la asimilación microbiana. Aunque también se ha detectado ácido fítico, este se encuentra principalmente en los fangos primarios, donde se acumula procedente de materia vegetal no degradada y de excrementos humanos, al tratarse de un compuesto que el organismo humano no metaboliza completamente.

1.2.1.1. ÁCIDO FÍTICO COMO P ORGÁNICO

Poniendo el foco en el compuesto de ácido fítico, este constituye la mayor parte del P total en los granos de semillas y, por lo tanto, es abundante en la dieta humana (Harland & Oberleas, 1987a). Sin embargo, los seres humanos no digieren el fitato de forma eficaz, por lo que puede constituir una fracción considerable del P total en las heces y las aguas residuales humanas.

En los piensos destinados a animales monogástricos, el P se encuentra mayormente ligado a sales del ácido fítico, conocidas como **fitato**. Esta forma de P es prácticamente indigestible para estos animales debido a la limitada actividad de las **fitasas** en su tracto digestivo, lo que impide la liberación del P y su posterior absorción. Como resultado, una fracción significativa de este nutriente es

excretada en las heces, **contribuyendo no solo a la pérdida de un recurso esencial, sino también a la contaminación ambiental.**

Además, las fuentes de P mineral son escasas y, como suplementos en la alimentación animal, representan el tercer nutriente más costoso, después de los suplementos energéticos y proteicos (Humer et al., 2015b). Esta problemática resalta la necesidad de mejorar la biodisponibilidad del P en los piensos mediante estrategias innovadoras, como la **suplementación con fitasa.**

El fitato también interfiere con la absorción de minerales esenciales al formar complejos insolubles, principalmente con cationes como calcio (Ca), magnesio (Mg), zinc (Zn), cobre (Cu) y hierro (Fe), lo que limita la biodisponibilidad de estos minerales. Esta fuerte quelación puede provocar deficiencias nutricionales tanto en animales como en humanos, especialmente en dietas basadas en cereales como arroz, trigo y maíz (Baruah et al., 2007).

Asimismo, el fitato puede unirse a proteínas, disminuyendo su **solubilidad, digestibilidad y actividad enzimática**, lo que afecta la eficiencia de la nutrición animal. Se ha demostrado que el fitato interfiere con enzimas digestivas clave, como la **amilasa, pepsina, tripsina y fosforilasa ácida**, reduciendo su actividad y limitando la utilización de nutrientes (Baruah et al., 2007; Cosgrove, 1973).

El impacto negativo del fitato no se limita a minerales y proteínas, sino que también afecta la **utilización de vitaminas**, lo que puede provocar una reducción en el consumo de alimento, mayor excreción de nutrientes en las heces, retraso en el crecimiento y problemas reproductivos en animales (Sugiura et al., 2001).

Dado este panorama, el uso de **enzimas fitasas** en la alimentación animal se presenta como una solución eficaz para **descomponer el fitato**, liberar el P orgánico y mejorar su absorción. Al optimizar la digestión del P presente en los piensos, las fitasas no solo **reducen la excreción de P en las heces**, disminuyendo la contaminación ambiental, sino que también **mejoran la eficiencia alimentaria**, reducen la dependencia de fuentes inorgánicas de P y optimizan la absorción de otros nutrientes esenciales. La eliminación del fitato (es decir, el desfosforilado) aumenta la biodisponibilidad del P,

de los cationes y también mejora el valor nutricional de la comida. Se han propuesto diversas estrategias para la desfosforilar el fitato, como el molido de cereales, la cocción, la fermentación, el humedecimiento, la autólisis, entre otras. Estos métodos de procesamiento pueden reducir el contenido de fitato hasta cierto punto, pero también pueden provocar la pérdida de minerales y otros nutrientes. Teniendo en cuenta las limitaciones de estos métodos y con el fin de maximizar el valor nutritivo de una dieta basada en plantas, es necesario catalizar la hidrólisis del fitato no digerible. En este contexto, la adición de fitasas comerciales exógenas se presenta como una solución definitiva para descomponer el fitato (Kumar & Sinha, 2018).

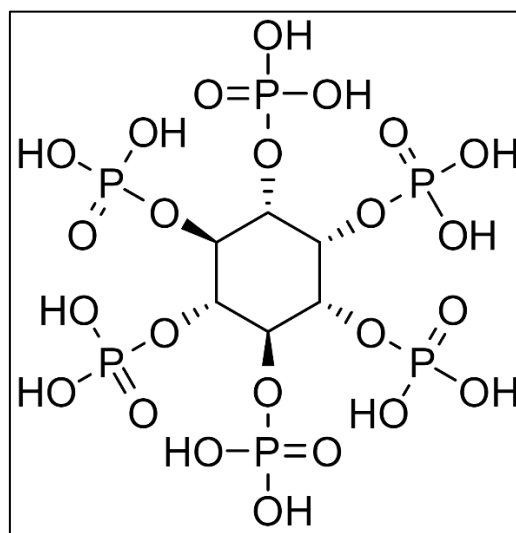


Figura 5 Estructura del ácido fítico.

Las fitasas son enzimas fosfohidrolíticas que catalizan la hidrólisis del fitato, liberando el P al medio en forma de $P-PO_4$. La suplementación con fitasa en alimentos para animales se ha convertido en una estrategia eficiente para mejorar la biodisponibilidad del P. Esto también minimiza la cantidad de P ligado al fitato excretado por los animales al medio ambiente. Hasta la fecha, los productos comerciales de fitasa se han explorado principalmente como aditivos para alimentos animales, especialmente en dietas de cerdos y aves (Kumar & Sinha, 2018).

Como se ha mencionado previamente, el **ácido fítico** y sus sales constituyen la mayor parte del P total en los granos de semillas y, por lo tanto, es abundante en la dieta humana (Harland et. al, 1987).

Sin embargo, los seres humanos no digieren el fitato de forma eficaz, por lo que puede **constituir una fracción considerable del P total en las heces y las aguas residuales humanas**. Por lo tanto, el ácido fítico puede acabar formando parte de los fangos de EDAR al ir asociado a las deyecciones ganaderas, las excreciones humanas y a los restos de semillas, legumbres u otras semillas que puedan formar parte del influente de la estación depuradora. (Joung et al., 2007).

La creciente adopción de la recuperación de P y la aplicación directa de fangos de EDAR a la tierra ha generado un **mayor interés en la caracterización de las especies de P en las aguas residuales y los fangos**. Teniendo en cuenta que las plantas solo pueden absorber P-PO₄ disuelto, gran parte del cual puede inmovilizarse rápidamente en el entorno del suelo, es importante comprender la especiación y la concentración de P en los fangos antes de su aplicación a los suelos (Peng et al., 2010). **Con un contenido de fitato fecal humano medido en un 24-54% del P total** (Joung et al., 2007), **es probable que los fangos de aguas residuales sean ricos en fitato**. En **fangos digeridos anaeróbicamente**, (Annaheim et al., 2013) utilizaron espectroscopia de resonancia magnética nuclear (en inglés, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, abreviado como NMR) de ³¹P para analizar la especiación de P y revelaron que el 91% estaba presente como P-PO₄, y el 9% restante **se identificó como fitato**. Pocos estudios han intentado evaluar la especiación del fitato a lo largo de las distintas etapas de tratamiento en una EDAR.

Smith et al. (2006) caracterizaron los compuestos de P en fangos líquidos no digeridos, fangos líquidos digeridos anaeróbicamente y torta deshidratada de una sola planta de tratamiento de aguas residuales. El análisis de NMR de ³¹P identificó al P-PO₄ como el grupo dominante de P en los tres tipos de fangos, que representa el 65-77% del P total extraído, pero también **encontraron que los niveles de fitato permanecieron inalterados por la digestión anaerobia**, lo que representa cerca del 10% del contenido total de P en todos los extractos de fangos. Por el contrario, a pesar de no medir específicamente la concentración de fitato, Li et al., 2019 **encontraron que los monoésteres de P-PO₄ se degradaban completamente por la digestión anaerobia**, siendo el P-PO₄ el único compuesto de P detectado en el fango digerido.

Estos **resultados potencialmente contradictorios** muestran que **no está claro** si la **persistencia del fitato durante el tratamiento anaeróbico de fangos se observa de forma generalizada**, y se requiere más trabajo para medir la concentración de fitato a través de las múltiples etapas del proceso.

Por lo tanto, resulta importante profundizar en el enfoque de intentar extraer el fitato antes de la digestión anaerobia desde dos puntos de vista: i) incrementar la recuperación de P de la fracción orgánica y ii) evitar que el fitato llegue en una proporción importante al suelo con el digerido, ya que el fitato es fuertemente adsorbido en el suelo. El fitato que se adsorbe fuertemente a la fase sólida del suelo o se precipita con cationes metálicos ya no es soluble y por tanto no es posible hidrolizarlo para ser aprovechado por las plantas.

1.2.1.2. P ORGÁNICO ASOCIADO A RESTOS VEGETALES

Los fangos de depuradora están compuestos por macromoléculas orgánicas, cuya concentración y proporción varía considerablemente. Las aguas residuales que ingresan a las EDAR no provienen únicamente de hogares particulares, sino también de cervecerías, industrias lácteas, papeleras o conserveras, entre otras (Lotfi Aski et al., 2020). En concreto, la presencia de industrias conserveras en el entorno de la EDAR implica una importante carga de materia orgánica vegetal en el influente, como restos de frutas, hortalizas y granos de cereales (Wen et al., 2023). Estos materiales, ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, contribuyen a una **biomasa lignocelulósica** en el fango que resulta especialmente resistente a la degradación, y que requiere tratamientos adecuados para su descomposición eficiente (Q. Zhu et al., 2021).

La biomasa lignocelulósica se encuentra compuesta por tres fracciones principales: celulosa, hemicelulosas y lignina. La celulosa consiste en un polímero de subunidades de D-glucosa y contiene regiones con una estructura cristalina organizada, así como regiones con una estructura amorfa poco organizada. Las cadenas de celulosa forman las llamadas fibrillas o haces de celulosa (Monlau et al., 2013). Las hemicelulosas, por su parte, son polímeros heterogéneos de azúcares como xilosa, manosa, galactosa, glucosa y arabinosa, que tienen una estructura ramificada y amorfa, lo que las hace más fácilmente degradables que la celulosa. La lignina es un polímero complejo y altamente

ramificado de fenilpropanoides, que actúa como una matriz rígida que rodea las fibras de celulosa y hemicelulosa, confiriendo resistencia estructural y protección frente a la degradación biológica.

La forma recalcitrante y la dificultad de degradación de esta dificulta el tratamiento óptimo de los fangos de EDAR. Como ocurre con casi cualquier recurso, los fangos de depuradora deben ser pretratados para convertirse en una biomasa eficiente y segura durante y después del proceso de fermentación. Estos tratamientos, además, deben ser económicamente viables y eficaces para los distintos tipos de fango (Monlau et al., 2013).

1.2.2. TRATAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES

Debido al contenido irregular y complejo de los contaminantes contenidos en las aguas residuales, es necesaria la combinación de diversos procesos de tratamiento, que tienen como objetivo reducir la carga contaminante de las aguas residuales hasta límites aceptables para el cauce receptor. Dichos tratamientos se llevan a cabo en EDAR, cuya función básica es recoger las aguas de una población y/o industria, y después de reducir la contaminación mediante ciertos tratamientos y procesos, la devuelve a un cauce receptor como un río, embalse, mar, etc. Dentro de un esquema general básico de una EDAR se pueden distinguir dos líneas de tratamiento diferenciadas: la línea de agua y la línea de fangos.

1.2.2.1. TRATAMIENTO DE LA LÍNEA DE AGUAS

Referente a la línea de aguas, se pueden distinguir tres tipos de tratamientos, que individual o conjuntamente dan lugar a cambios en la calidad del agua:

- **Tratamientos físicos:** se basan en la aplicación de fenómenos físicos como son: la fuerza gravitatoria, la fuerza centrífuga, la fuerza de retención, y la fuerza de cohesión. Entre los tratamientos, realizados en una EDAR, que responden a operaciones físicas se encuentran: el desbaste, el desengrasado, el desarenado, la sedimentación y la flotación, entre otros.
 - **Tratamientos químicos:** son aquellos provocados por la adición de productos químicos para provocar reacciones que favorezcan la eliminación de los contaminantes. Relacionados con
-

los procesos químicos hay diversos tratamientos de aguas residuales como son: la floculación, la coagulación, la neutralización, la oxidación, la reducción, el intercambio iónico, la absorción, y la desinfección.

- **Tratamientos biológicos:** son los que producen cambios en la calidad del agua utilizando reacciones bioquímicas, asociadas a organismos vivos. Los microorganismos crecen utilizando los contaminantes biodegradables del agua como fuente de carbono y/o como fuente de energía, convirtiéndolos en nueva biomasa, dióxido de carbono y otros compuestos inocuos. Los sistemas más característicos son: fangos activados, filtros percoladores, biodiscos, lechos de turba (J Ferrer, 2017), biorreactores de membrana y reactores de manto de fangos y flujo ascendente (UASB, Upflow Anaerobic Sludge Blanket).

Debido a su importancia en cuanto a la eliminación de nutrientes del agua residual, se trata a continuación con más detalle los tratamientos biológicos.

1.2.2.2. TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

El principio del tratamiento biológico de las aguas residuales es el mismo que el de la purificación espontánea en aguas naturales. Se realiza en reactores diseñados especialmente para mantener los microorganismos bajo condiciones controladas, acelerando el proceso natural de descomposición y neutralización de los residuos, antes de que las aguas sean finalmente vertidas a las masas de agua receptoras.

El tratamiento biológico de las aguas residuales consiste en una serie de procesos de tratamiento que tienen como factor común la utilización de microorganismos, que se mantienen en suspensión en el agua o bien se adhieren a un soporte sólido formando una capa de crecimiento, para llevar a cabo la eliminación de componentes solubles presentes en el agua residual. Los organismos más importantes que intervienen en los sistemas de tratamiento biológico son: bacterias, protozoos, hongos, algas, rotíferos y nematodos.

Los procesos biológicos aprovechan la capacidad metabólica de los microorganismos, de asimilar la materia orgánica y los nutrientes (N y P), disueltos en el agua, para su propio crecimiento. Cuando se reproducen, se agregan entre ellos y forman unos flóculos macroscópicos con suficiente masa crítica como para decantar en un tiempo razonable.

Dichos procesos se pueden clasificar, según el aceptor de electrones del metabolismo microbiano, que juega un papel fundamental en la oxidación de la materia orgánica que se pretende eliminar, en tres tipos:

- **Sistemas aerobios:** en presencia de oxígeno, es dicho elemento el aceptor final de electrones, lo cual conlleva a unos rendimientos energéticos elevados y a una importante generación de fangos, dado el alto crecimiento de las bacterias en condiciones aerobias.
 - **Sistemas anaerobios:** en este caso el aceptor final de electrones es parte de la propia materia orgánica, que actúa como fuente de carbono. La descomposición de la materia orgánica por las bacterias se realiza en ausencia de oxígeno, convirtiéndola en dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4). Los productos finales de la digestión anaerobia son el biogás y los fangos de digestión. El biogás es una mezcla gaseosa de CH_4 , CO_2 , hidrógeno (H_2), nitrógeno gas (N_2) y sulfuro de hidrógeno (H_2S), que se puede aprovechar para la producción energética, siendo ésta una importante ventaja frente a los sistemas aerobios; y los fangos de digestión que están formados por compuestos no biodegradables y biomasa, se producen en poca cantidad, sumando una ventaja más a dichos procesos.
 - **Sistemas anóxicos:** en estos sistemas los aceptores finales de electrones suelen ser los nitratos, en ausencia de O_2 . Cuando el aceptor final es el nitrato, como resultado del proceso metabólico, el N de la molécula de nitrato es transformado en N_2 (fase gaseosa). De esta manera, dadas unas ciertas condiciones de operación, se puede conseguir la eliminación biológica del N del agua residual (desnitrificación).
-

1.2.2.3. ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DEL AGUA RESIDUAL

El endurecimiento de la normativa de depuración de aguas residuales, sobre todo en lo que se refiere a la concentración de nutrientes en el vertido, ha hecho que en los últimos años las EDAR se tengan que adaptar a la eliminación tanto de materia orgánica, como de N y P. La eliminación por vía físico-química puede resultar de interés en casos con alta carga de nutrientes, aunque suele implicar un consumo elevado de recursos, tanto en forma de reactivos como de energía. Por ello, resulta especialmente relevante el uso de vías biológicas, que permiten una eliminación más sostenible y eficiente. Además, la eliminación biológica de P permite la recuperación posterior de este recurso, en la que se va a profundizar más adelante en este apartado.

En todos los procesos biológicos se eliminan nutrientes cuando son utilizados como constituyentes celulares, es decir, cuando funcionan como nutrientes. Sin embargo, existen procesos biológicos en los que se consume y elimina una mayor concentración de estos nutrientes que la estrictamente necesaria como constituyente de la biomasa. Se trata de procesos como la nitrificación-desnitrificación o la bioacumulación de fosfatos.

En el caso de combinar tratamientos biológicos de depuración con tratamientos físico-químicos de eliminación de P o de N, es muy importante tener en cuenta las necesidades mínimas de nutrientes para el desarrollo de los microorganismos que interviene en el proceso biológico, puesto que se pueden generar problemas por déficit de nutrientes, limitando el correcto desarrollo de la biomasa.

1.2.2.3.1. ELIMINACIÓN DE N

La eliminación de N de las aguas residuales se lleva a cabo en las EDAR mediante los procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación. Estos son realizados por organismos procariontes quimioautótrofos capaces de oxidar el amonio (N-NH_4) y el nitrito hasta nitrato y organismos heterótrofos capaces de utilizar nitrato o nitrito como aceptores finales de electrones en condiciones de ausencia de oxígeno.

1.2.2.3.2. ELIMINACIÓN DE P

El P-PO_4 , es la especie de P más abundante en las aguas residuales. Tradicionalmente se han empleado procesos físico-químicos para eliminar el P de las aguas residuales, puesto que el P-PO_4 es un reactivo presente en muchas reacciones químicas. También el polifosfato reacciona con sales de metales, mientras que el P orgánico puede ser convertido tanto a P-PO_4 como a polifosfato.

Por todo ello, el método más utilizado, tradicionalmente, ha sido la precipitación química, que se lleva a cabo mediante la adición al agua residual de sales de Al, Ca o Fe. Sin embargo, existen métodos para la eliminación del P de forma biológica, cuyo fundamento se basa en la alternancia de condiciones anaerobias (ausencia de oxígeno y nitratos) y aerobias.

PRECIPITACIÓN QUÍMICA DE P

La eliminación biológica de P en sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales se limita al consumo del nutriente como constituyente celular, que suele estar entre el 1.5 y el 2% en peso de la biomasa, para un máximo de eliminación de entre el 10 y el 25% del P total influente (Metcalf & Eddy, 1995). La eliminación de P por esta vía no alcanza para cumplir con los límites de vertido, por lo que suele ser necesario aplicar tratamientos físico-químicos.

Para obtener una eliminación adicional de P se suele utilizar la adición de sales metálicas para la precipitación química de las formas inorgánicas de fosfato. Se basa en la adición de sales de Al, Fe o Ca de manera que los iones metálicos reaccionan con los iones fosfato para dar lugar a precipitados muy poco solubles en agua. Las sales más utilizadas son: sulfato de aluminio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$, aluminato de sodio $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{O}_4$, cal $\text{Ca}(\text{OH})_2$, cloruro férrico FeCl_3 , cloruro ferroso FeCl_2 , sulfato férrico $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ y sulfato ferroso FeSO_4 .

Este método se acompaña con procesos simultáneos de coagulación-floculación y una correcta sedimentación que maximice la eficiencia del tratamiento. Sin embargo, el uso de estas sales conlleva a un incremento en la producción fangos.

Sin embargo, el hecho de producir gran cantidad de fango en exceso y el costo por consumo de reactivos químicos (p. ej., hierro o sales de aluminio), han permitido que la alternativa de eliminación por vía biológica se implemente cada vez más.

ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE P

El EBPR es un proceso utilizado para la eliminación biológica del P. Se caracteriza por someter al fango a una alternancia de condiciones anaerobias y aerobias en las cuales las bacterias PAO, sueltan y toman P respectivamente. En este proceso son importantes como nutrientes algunos cationes metálicos como el Mg, potasio (K) y Ca. Además, el potasio y el magnesio son necesarios porque mantienen la neutralidad de los polifosfatos en el interior de las bacterias PAO. Sin ellos se inhibiría el proceso de eliminación biológica de P.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la eliminación biológica de P se basa en su incorporación al interior de los microorganismos y su posterior retirada mediante la purga del fango en exceso. En la mayoría de los casos, el P representa una pequeña fracción de su peso, 1,5-2,0 % en peso seco (Sedlak, 1991). En consecuencia, el crecimiento de la biomasa en un proceso biológico produce un consumo natural del P del agua residual. De esta manera, la cantidad de P eliminado dependerá de la producción neta de sólidos. El contenido de P en el tejido celular es del orden de una quinta parte del contenido de N, pero puede variar en función de las condiciones ambientales específicas (Metcalf & Eddy, 1995). El factor básico de los procesos diseñados para la EBPR es hacer que en los microorganismos responsables realicen un consumo de este nutriente superior a los niveles de asimilación normal. Esto se ha conseguido tradicionalmente por la exposición del fango a secuencias aeróbicas/anaeróbicas alternadas. De esta manera, el P no sólo se emplea para el mantenimiento celular, síntesis y transporte de energía, sino también para almacenarlo como reserva para su uso posterior.

El proceso de eliminación biológica de P consta de dos fases (ver Figura 6). La **primera fase** requiere **condiciones anaerobias** y la disponibilidad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como los ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta, que son fácilmente almacenables por los microorganismos encargados del proceso, principalmente en forma de acetato y propionato. En esta

fase, los microorganismos acumuladores de P (PAO) almacenan estos compuestos orgánicos en forma de poli-hidroxialcanoato (PHA), que pueden llegar a constituir el 50% del peso seco de la célula. La energía necesaria para esta síntesis la proporcionan los polifosfatos acumulados, que liberan $P-PO_4$, así como cationes de Mg, K y Ca, al licor mezcla durante su descomposición. Esto hace que, en condiciones anaerobias, la concentración de $P-PO_4$ en el reactor aumente (Sedlak, 2018).

En una **segunda fase**, en **condiciones aerobias**, las células consumen los compuestos orgánicos almacenados en la fase anterior, utilizándolos como fuentes de energía y carbono para el crecimiento celular y para la acumulación, en forma de polifosfatos, de los $P-PO_4$ disponibles en el licor mezcla. La concentración de los fosfatos incorporados a las células durante esta fase aerobia sobrepasa la cantidad de fosfatos disueltos durante la fase anaerobia, produciéndose una eliminación neta de P del sistema. El contenido de P acumulado en el interior de las PAO oscila entre 2,5 y 5,0%, referidos a materia seca (Sedlak, 2018). La purga de fangos elimina el P acumulado en las células del reactor.

Los parámetros químicos clave en la aplicación del sistema EBPR son el contenido en materia orgánica del influente, medido en términos de Demanda Química de Oxígeno (DQO), el contenido en AGV, concentración de cationes metálicos, carga de P, pH o relación materia orgánica/microorganismos. Además de los parámetros químicos, los parámetros operacionales más relevantes son la temperatura durante el proceso, la alcalidad del fango, la sedimentabilidad, la aireación (medida como oxígeno disuelto), así como la liberación de P en condiciones anaerobias y su posible redisolución en otras etapas del tratamiento, tal como se recoge en el trabajo de Mulkerrins et al., 2004.

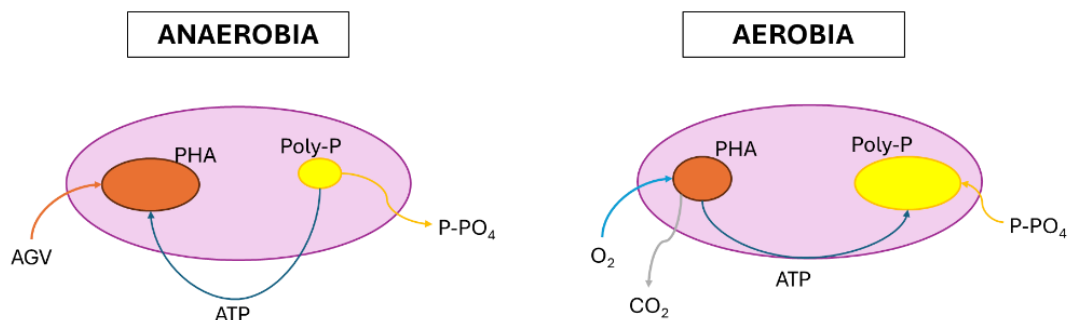


Figura 6. Proceso de eliminación biológica de P.

En el caso de la eliminación biológica de P el tratamiento biológico debe incluir un tanque anaerobio donde las bacterias PAO puedan almacenar el máximo sustrato posible para obtener ventaja competitiva frente a las bacterias heterótrofas de crecimiento más rápido en condiciones aerobias. Posteriormente debe incluir un tanque aerobio donde las bacterias PAO absorban el máximo P posible en el interior celular de modo que el agua quede con concentraciones bajas de este nutriente (ver Figura 7). Esta configuración se conoce como **A/O (Anaerobio/Oxidación)** (Minnesota Pollution Control Agency, 2011).

En este caso, el P se elimina como Poly-P dentro de la biomasa celular por los fangos residuales (Burton, 2014). Las bacterias PAO pueden incorporar hasta 0,38 mg P/mg VSS en comparación con los 0,02 mg P/mg VSS incorporados por los organismos heterotróficos ordinarios (Gebremariam et al., 2011; Ye et al., 2016). Las plantas de tratamiento de aguas residuales basadas en EBPR pueden eliminar normalmente más del 85 % del P del afluente, que se almacena dentro de la biomasa (Bunce et al., 2018; Gebremariam et al., 2011). El rango informado del contenido de P en fangos basados en EBPR es de alrededor de 0,06 a 0,15 mg P/mg VSS (Henze, 2008).

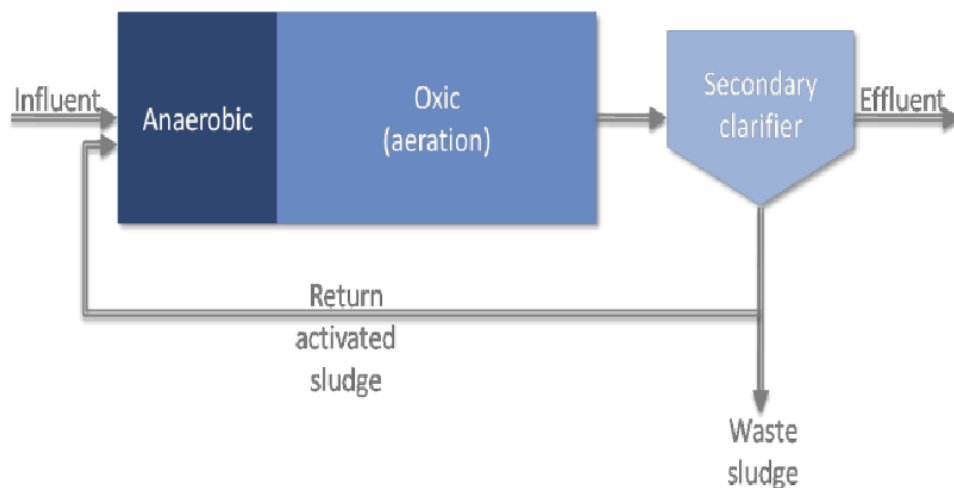


Figura 7. Configuración A/O para la eliminación biológica de P en EDAR (Fuente: (Minnesota Pollution Control Agency, 2011)).

En la Figura 8 se establece un balance de corriente de masa simplificado para una EDAR con proceso EBPR incorporado, en el que el P se elimina con el fango primario y el fango biológico (secundario).

Aproximadamente entre el 10 y el 25 % del P del afluente se elimina con el fango primario, que generalmente se espesa mediante sedimentación por gravedad, predominantemente como partículas orgánicas de P.

Con el fango biológico se extrae aproximadamente el 50 – 80% de la carga de P del afluente, por lo que en el efluente de la EDAR solo queda aproximadamente el 10% de la carga de P del afluente, lo que da como resultado una concentración de efluente de menos de 1 mg/L de P.

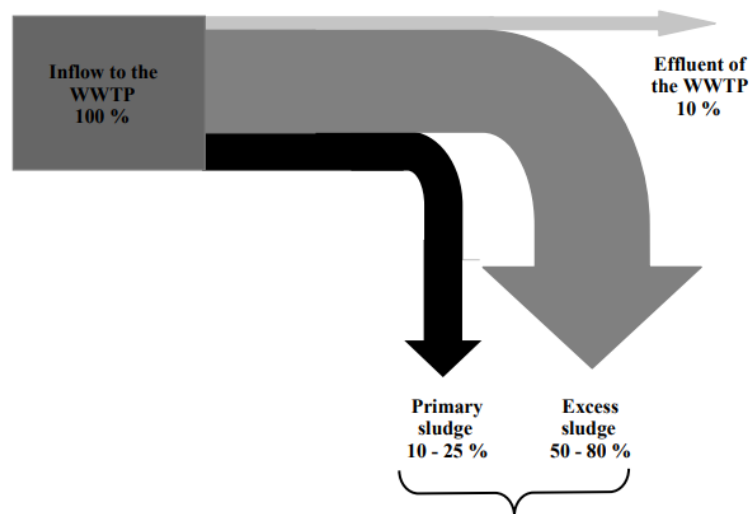


Figura 8. Balance de P en EDAR con eliminación biológica de P (EBPR) (Fuente: (Heinzmann, 2005).

1.2.2.3.3. ELIMINACIÓN BIOLÓGICA SIMULTÁNEA DE NUTRIENTES

Para la eliminación conjunta de N y P de los fangos, se requiere la combinación de etapas anaerobias, anóxicas y aerobias para alcanzar la calidad requerida en el efluente de la estación depuradora de aguas residuales (Pastor, 2008). En la zona anaerobia, las bacterias PAO toman los AGV contenidos en las aguas residuales o generadas a partir de los procesos de fermentación de las bacterias heterótrofas facultativas. Posteriormente, en la zona anóxica y aerobia, se llevan a cabo los procesos de desnitrificación, nitrificación y asimilación de P del medio (C. Li et al., 2019).

Existen diferentes procesos conjuntos de eliminación biológica de nutrientes que combinan de diferentes formas las etapas mencionadas. Los esquemas de eliminación de nutrientes normalmente

son denominados por el nombre de la patente correspondiente. En la actualidad se están desarrollando sistemas alternativos de eliminación biológica de nutrientes bien para completar o para sustituir los sistemas de fangos activados con altas necesidades energéticas en aireación por sistemas de digestión anaerobia más eficientes. Se están implementando sistemas biológicos complejos con desnitrificación desde nitrito, mediante ANNAMOX, reactores SHANON, BABE e incluso con la utilización de eliminación físico-química de nutrientes para determinadas corrientes ricas en nutrientes (van Loosdrecht & Salem, 2006).

El esquema más sencillo es el A2/O (Di Capua et al., 2022), diseñado para la eliminación de N y de P, aunque la desnitrificación completa no es posible. Básicamente, el proceso A2/O es una modificación del proceso A/O, ya que añade una zona anóxica entre las zonas anaerobia y aerobia (ver Figura 9).

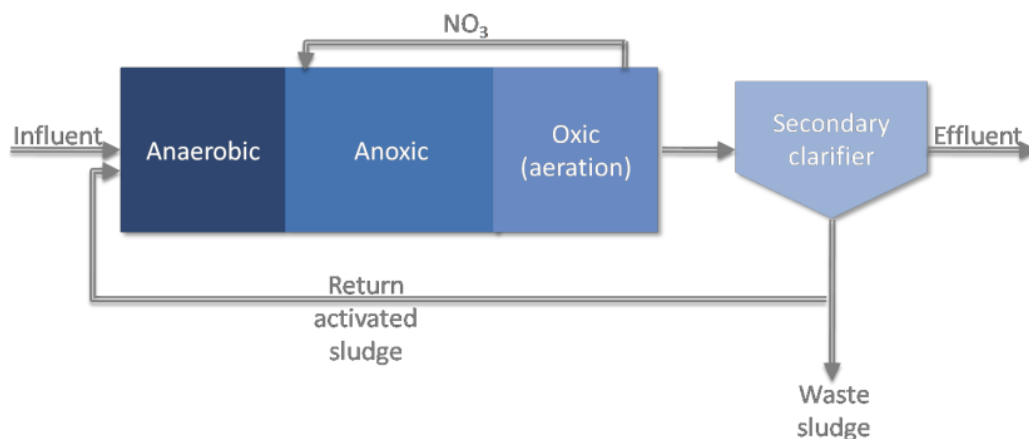


Figura 9. Configuración A2/O para la eliminación de P y N (Fuente: (Minnesota Pollution Control Agency, 2011).

La zona anóxica se incluye solamente para reducir las cargas de nitrato sobre la zona anaerobia mediante el caudal de recirculación de fangos, lo que afectaría a la eliminación de P (L. K. Wang, 2010). **Este proceso es el que utiliza actualmente para la eliminación de nutrientes en la EDAR de Calahorra, de la que se extraen los sustratos utilizados para el desarrollo de los ensayos experimentales realizados en el marco de la presente tesis.**

1.2.2.4. TRATAMIENTO DE LA LÍNEA DE FANGOS

El producto final de los procesos que tienen lugar en las estaciones depuradoras de aguas residuales es una suspensión sólido-líquido de materiales en agua, que recibe el nombre de fango. Los fangos de EDAR se generan en gran cantidad y su gestión inadecuada puede representar una problemática medioambiental grave, por lo que el tratamiento de estos está regulado bajo legislaciones específicas y permite, una vez tratados, que se puedan emplear como fertilizantes para el sector agrícola.

Los tratamientos sobre los fangos tienen como objetivo:

- La reducción de su contenido en humedad, para minimizar los costes de operación. Se suelen utilizar procesos como el espesamiento, deshidratación y secado de fangos.
- La reducción de su contenido en materia orgánica, para la estabilización de los fangos. Se emplean procesos de digestión anaerobia, compostaje, entre otros.
- El acondicionamiento de los fangos para su reutilización o evacuación final.

También se puede realizar tratamientos con otros objetivos como producir gas metano, reducir los olores de los fangos o reducir la concentración de microorganismos patógenos cuando el fango se destina a uso agrícola.

Entre los procesos más comunes se encuentran el espesado, la estabilización, la deshidratación, el secado y la higienización, que pueden aplicarse de forma combinada o secuencial. Dentro de las opciones de estabilización, destacan dos métodos principales de digestión: aerobia y anaerobia.

Generalmente se prefiere la digestión anaerobia debido a que la cantidad de biomasa producida por unidad de sustrato degradado es mucho menor en los tratamientos anaerobios que en los aerobios. Así mismo, de los procesos anaerobios es posible obtener biogás, uno de los vectores energéticos más importantes en la actualidad en cuanto a energía renovable. Además, reduce la cantidad de patógenos presentes y la cantidad de biomasa por destrucción de sólidos volátiles con niveles que van del 40 al 65% en función del contenido de materia fácilmente degradable (carbohidratos simples, celulosa, proteínas y grasas) presente en el fango.

1.2.2.4.1. DIGESTIÓN ANAEROBIA

De forma general, la degradación anaerobia de la materia orgánica se produce debido a la acción de diferentes grupos de microorganismos sobre determinados sustratos. Las características cinéticas y termodinámicas de estas bacterias, así como de sus sustratos pueden variar ampliamente. La diferenciación entre los distintos grupos de bacterias implicados en la degradación anaerobia de la materia orgánica se basa en los sustratos que utilizan y en los productos finales de su metabolismo.

El tratamiento anaerobio es un proceso bioquímico en el cual un grupo de diferentes tipos de microorganismos, en ausencia de oxígeno molecular y de nitratos, promueven la transformación de compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, proteínas y lípidos) en productos más simples como CH_4 , CO_2 , sulfhídrico (H_2S) y N-NH_4 . Una representación esquemática de los procesos bioquímicos en la digestión anaerobia se muestra en la Figura 10.

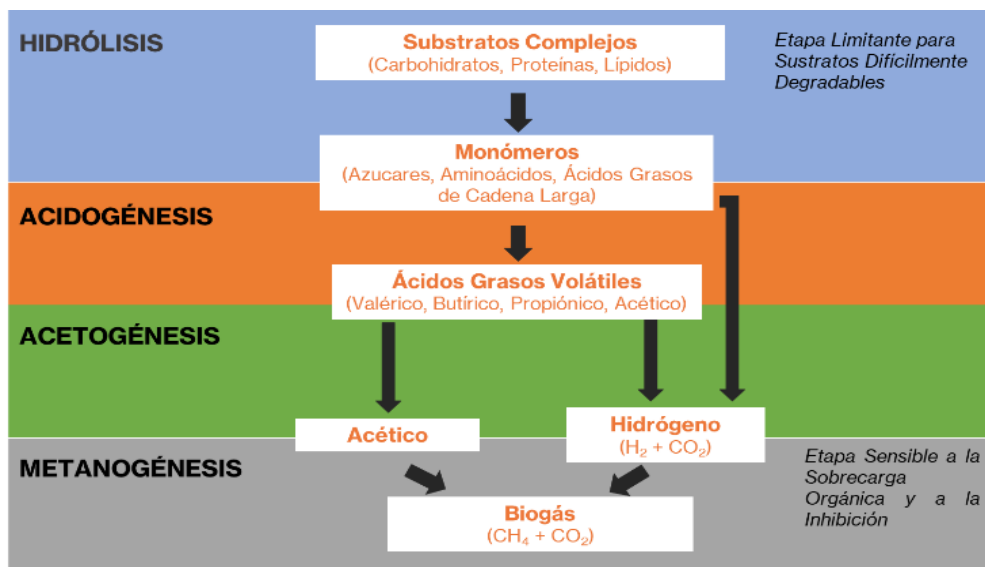


Figura 10. Transformaciones que tienen lugar en el proceso de digestión anaerobia.

A continuación, se describen las características de cada una de las etapas que intervienen en un proceso de digestión anaerobia:

Hidrólisis

Es la primera fase del proceso anaerobio. En esta etapa se produce la ruptura de las moléculas de los polímeros orgánicos, que forman parte de la biomasa a moléculas más simples. Con la finalidad de que sean aprovechadas las partículas complejas por las bacterias, la materia orgánica debe ser solubilizada, lo que se logra por la acción de determinadas enzimas extracelulares segregadas por los microorganismos. En esta fase, las partículas y moléculas complejas son hidrolizadas a compuestos solubles más sencillos: los carbohidratos se hidrolizan a azúcares, las proteínas a péptidos y aminoácidos. En el caso de los lípidos, estos son hidrolizados a ácidos grasos de cadena larga, siendo ácidos orgánicos el producto final (Michael H. Gerardi, 2003).

Acidogénesis:

La acidogénesis, también conocida como fermentación ácida, se caracteriza por la degradación de los azúcares y de los aminoácidos producidos en la etapa de hidrólisis por acción de las bacterias acidogénicas. Este proceso da lugar a la aparición de compuestos orgánicos intermedios más reducidos (propiónico, butírico, láctico, etanol) y a precursores directos de la formación de metano como son el acético y el hidrógeno (H_2) y CO_2 (Michael H. Gerardi, 2003).

La fermentación ácida se caracteriza por una disminución del pH, desde valores cercanos a pH neutro hasta valores próximos a 5,0. Debido a esta disminución de pH, esta etapa es llevada a cabo por los organismos a los que favorece un ambiente ácido.

Acetogénesis

La acetogénesis es un proceso que engloba las reacciones de degradación de los productos de las etapas anteriores, bien sean los productos intermedios de la etapa acidogénica o bien los ácidos de cadena larga producidos en la hidrólisis de lípidos, por acción de las bacterias acetogénicas. Los principales productos de esta ruta metabólica son ácidos grasos de cadena corta y precursores directos de metano: hidrógeno, dióxido de carbono y acético (Michael H. Gerardi, 2003).

Metanogénesis

La metanogénesis es la última etapa del proceso anaerobio, donde los productos de las etapas anteriores son transformados en metano, CO₂, ácido sulfhídrico y sales minerales (principalmente Mg y K) por acción de las arqueas metanogénicas.

Esta etapa se conoce también como periodo de digestión intensa, estabilización y gasificación. En ella son utilizados los materiales nitrogenados más resistentes, como las proteínas y los aminoácidos, disminuyendo el contenido de ácidos volátiles. El pH aumenta hasta un valor comprendido entre 6,8 y 7,4, produciéndose grandes volúmenes de gases.

Es en esta etapa en donde tiene lugar la estabilización de los fangos al convertirse los ácidos orgánicos en anhídrido carbónico y metano; el gas metano así producido es insoluble y su separación de la solución provoca la estabilización del fango. Este proceso no solo reduce la carga orgánica y los olores del fango, sino que también permite valorizar el biogás generado como fuente de energía renovable, cerrando el ciclo de tratamiento con un enfoque más sostenible (Michael H. Gerardi, 2003)..

PRECIPITACIÓN INCONTROLADA DE P EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

En EDAR con **eliminación biológica de P en la línea de aguas** y con **digestión anaerobia de los fangos producidos**, un **elevado porcentaje del P** que entra en la línea de fangos **se pierde por precipitación incontrolada**, fundamentalmente en los digestores. Esta pérdida de P oscila entre 13-14 gP por kg de fango tratado en la línea de fangos, atribuyéndose entre el 68-76% de estas pérdidas a la precipitación incontrolada en el digestor (Barat et al., 2009; Martí et al., 2017).

Esto es debido a que las condiciones en determinados puntos del proceso, como el pH, la concentración de fosfatos y la concentración de cationes metálicos, entre otros, son adecuadas para la formación de fosfatos y carbonatos cálcicos y de magnesio. Este mecanismo de fijación del P por vía química puede llegar a representar hasta un 80% del P particulado presente en el sistema (Barat, 2004).

En el proceso EBPR, los fosfatos y otros iones (por ejemplo, Mg^{2+} , K^+) son absorbidos y almacenados como polifosfatos (Poly-P) dentro de las células bacterianas. Durante el proceso de digestión anaerobia, estos polifosfatos son liberados a la fase líquida (Wild et al., 1997) aumentando notablemente la concentración de fosfato, magnesio y potasio. La Figura 11 muestra los procesos de liberación y de fijación del P durante la digestión anaerobia en estado estacionario.



Figura 11. Procesos de liberación y fijación de P durante la digestión anaerobia de fango (Fuente: Barat, 2004).

Relacionado a estas reacciones se encuentra la liberación de K y Mg contenidos en la estructura del polifosfato $(K_{0.33}Mg_{0.33}PO_3)_n$. El incremento de la concentración de P y Mg, asociado al aumento del $N-NH_4$ debido a la descomposición de la materia orgánica y a la presencia de cationes metálicos como Ca, Fe y Al, a valores de pH neutros, ocasiona la precipitación en el interior de los digestores anaerobios, de fosfato de amonio y magnesio hexahidratado ($MgNH_4 PO_4 \cdot 6H_2O$) conocido con el nombre de **estruvita**.

La precipitación de estruvita es un proceso natural que tiene lugar cuando las concentraciones de los iones Mg, $N-NH_4$ y $P-PO_4$ exceden el producto de solubilidad. La acumulación de estruvita en las paredes de las tuberías y en las superficies de los equipos de los procesos de digestión anaerobia y posdigestión (ver Figura 12) se ha señalado como un problema frecuente en la industria de tratamiento de aguas residuales (Ohlinger et al., 1999).



Figura 12. Depósitos de precipitados: (a) Tubería de la línea de fangos con precipitados; (b) Depósito de estruvita (Fuente: PHORWater, s. f.).

1.2.2.5. RECUPERACIÓN DE P EN FORMA DE ESTRUVITA COMO FERTILIZANTE

Las tecnologías de recuperación de P a partir de flujos con P disuelto (p. ej., efluentes de EDAR, sobrenadantes de digestores) mediante precipitación o cristalización como estruvita o fosfatos cálcicos producen materiales más limpios y disponibles para los cultivos que las tecnologías que recuperan P a partir de cenizas de fangos de depuradora, mediante la incineración de los fangos. Cabe mencionar, sin embargo, que las tasas de recuperación de P (<25% en relación con la entrada de la EDAR) son relativamente bajas en comparación con las obtenidas en los procesos de incineración (~40-50% en relación con la entrada de la EDAR) (Egle et al., 2016).

Además, tal y como se ha comentado en el apartado anterior, el bloqueo de las tuberías debido a la acumulación de estruvita es un problema común en las EDAR. Por lo tanto, la eliminación y recuperación de P previo a que se produzcan estos atascos puede reducir los costos de mantenimiento y aumentar la eficiencia de la operación de la planta (Parsons & Smith, 2008; Petzet & Cornel, 2012).

En este contexto, la aplicación de la cristalización de estruvita a escala real se ha enfocado en la recuperación de P en el efluente del proceso de deshidratación tras la digestión anaerobia, lo que reduce su concentración en este tipo de corriente, ya que una cantidad importante de P se pierde en los sistemas de post-digestión debido a la precipitación incontrolada (Battistoni et al., 2002). No obstante, se continúa perdiendo una parte importante del P, que precipita en el interior de los digestores anaerobios, causando además problemas operacionales en la planta.

Los principales factores que controlan la precipitación de estruvita son el pH y la relación molar $\text{Mg:NH}_4\text{:PO}_4$ (X. Liu et al., 2013). La aplicación externa de Mg es necesaria si no hay, o si está presente en concentraciones inferiores a la relación molar $\text{Mg:NH}_4\text{:PO}_4$ requerida para la precipitación de estruvita, que teóricamente es de 1:1:1. En la práctica, las relaciones molares son ligeramente más altas con respecto al Mg^{2+} . Por ejemplo, a una relación molar de $\text{Mg:NH}_4\text{:PO}_4$ de 1,5:1:1, la recuperación de P fue del 90 a 95 % (Uysal et al., 2010). El pH de la reacción afecta la formación de estruvita porque su precipitación ocurre a un pH ligeramente alcalino. A un pH de 7,0 o menos, se formará muy poca estruvita (Hjorth et al., 2011). Sin embargo, la formación de estruvita aumentará a medida que aumenta el pH en la corriente de desechos.

La cristalización de la estruvita ha sido ampliamente estudiada a escala de laboratorio (Battistoni et al., 2002; Lahav et al., 2013; Marti et al., 2008; Pastor, 2008). En cuanto a su escalado industrial, en plantas de tratamiento de aguas residuales de todo el mundo se han puesto en funcionamiento varios sistemas de recuperación de estruvita a gran escala. En la Tabla 1 se ofrecen referencias seleccionadas sobre la precipitación de estruvita y sus condiciones.

La precipitación de estruvita representa una alternativa eficaz para recuperar P en forma de fertilizante a partir del digerido procedente de la digestión anaerobia. La estruvita es un **valioso fertilizante de liberación lenta** (Worwąg, 2018), lo que crea un uso valioso para el precipitado recuperado y elimina los nutrientes fuera de la explotación. Además, la precipitación y recuperación controladas de estruvita también podrían reducir los costos de mantenimiento de los sistemas de reciclaje de aguas residuales al eliminar la precipitación indeseable de estruvita en tuberías y bombas.

Tabla 1. Precipitación de estruvita y condiciones de operación.

Corriente de residuos	pH	Relación molar Mg:N:P	Fuente de Mg	Recuperación de estruvita	Referencia
Efluente de laguna de cerdos anaeróbica	8.9 – 9.25	1:1:1 a 1.6:1:1	MgCl ₂ ·6H ₂ O	96%	Nelson et al., 2003
Corriente de licor	9.0	1.05:1	MgCl ₂ ·6H ₂ O	97%	Jaffer et al., 2002
Aguas residuales sintéticas de cerdo	9.5 – 10.5	1.4:1:1	MgCl ₂ ·6H ₂ O	<97%	Song et al., 2011
Efluente de digestor anaeróbico de lodos de depuradora	8.0 – 9.0	1.5:1:1	MgCl ₂ ·6H ₂ O + 85% H ₃ PO ₄	95%	Uysal et al., 2010
Aguas residuales de la industria de fertilizantes	8.5 – 10.0	1.2:1:1	MgCl ₂ ·6H ₂ O + NH ₄ Cl	85%	Hutnik et al., 2013
Efluente de digestor de estiércol avícola	8.5 – 9.5	1.5:1:1			Yilmazel & Demirer, 2011

1.2.3. RECUPERACIÓN DEL P EN UNA EDAR

La aplicación directa de fangos enriquecidos con P tras la estabilización es una técnica de recuperación sencilla. Sin embargo, está prohibida en muchos países debido a la posible presencia de metales pesados, contaminantes orgánicos persistentes y patógenos (Harrison et al., 2006). Este factor, junto con el creciente interés en la recuperación de P, ha impulsado la investigación, el desarrollo y la implementación a gran escala de diversas técnicas para recuperar P de distintas corrientes después de la digestión anaerobia de fangos (como Airprex®, Nuresys y Elophos®) o de

concentrados de centrifugación (como Naskeo®, Ostara Pearl®, PHOSPAQ® o STRUVIA™). En condiciones ácidas, es posible recuperar más P, ya que parte de la materia orgánica se mineraliza y los compuestos precipitados se vuelven a disolver tras la digestión anaerobia (procesos Seaborne y Stuttgart) (Roldán et al., 2020).

No obstante, el **potencial** de estos procesos es **limitado**, ya que **no pueden evitar la precipitación incontrolada de los compuestos de P en el interior de los digestores anaerobios** y los sistemas de post-digestión (Egle et al., 2016). La posibilidad de estos problemas de precipitación incrementa con el aumento del contenido de P de los fangos activados residuales, mayor en el caso de fangos procedentes de EBPR.

1.2.3.1. SOLUCIONES PARA LOS PROBLEMAS DE PRECIPITACIÓN DE P EN EL INTERIOR DE LOS DIGESTORES ANAEROBIOS

En vista de lo mencionado, un paso de **recuperación de P antes de la digestión anaerobia** puede tener una **ventaja** potencial para controlar los problemas de depósito de estruvita en los procesos de manipulación de fangos (Takiguchi et al., 2004). En este sentido, existen algunas modificaciones del proceso EBPR para mejorar aún más la eliminación de P en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Estas modificaciones no solo permiten garantizar corrientes ricas en P, sino que también facilitan su integración en un proceso de cristalización en forma de estruvita, contribuyendo a reducir la precipitación incontrolada de P en el digestor.

1.2.3.1.1. ELUTRIACIÓN DE FANGO DE EDAR PARA LA POSTERIOR RECUPERACIÓN DEL P INORGÁNICO EN FORMA DE ESTRUVITA

Entre las posibles soluciones a la precipitación de P en el interior de los digestores anaerobios se encuentra el proceso de elutriación, que consiste en poner en contacto una corriente de fangos biológicos, ricos en bacterias acumuladoras de P (PAO), con una corriente de fangos ricos en AGV (fangos primarios), en condiciones anaerobias. En estas condiciones, las bacterias PAO almacenan la energía que le aportan los ácidos volátiles mediante la descomposición de los polifosfatos que han acumulado anteriormente, descargando el P al medio. Tras este proceso, se obtiene una corriente

de agua muy enriquecida en fosfatos. Estas condiciones se suelen dar en elementos de la línea de fangos como pueden ser cámara de mezcla de fangos espesados primario y secundario, digestor anaerobio y tuberías.

Este proceso tiene sus antecedentes en los estudios realizados en cuanto a la fermentación de los fangos de EDAR para incrementar la producción de AGVs in-situ (Guo et al., 2017; J. Liu et al., 2017).

Los **procesos biológicos de eliminación de nutrientes dependen del carbono biodegradable disponible** en las aguas residuales que se estén tratando (Pelaz et al., 2018; Shen & Zhou, 2016). Por lo tanto, cuando estas no presentan un alto contenido de DQO fácilmente biodegradable, especialmente **AGV**, se plantea como alternativa aumentar esta concentración mediante la adición de sustrato externo (p.e. acetato) o también se pueden producir en la propia EDAR mediante la fermentación del fango primario.

La fermentación de fangos no solo produce una gran cantidad de materia orgánica disuelta, sino que también reduce la cantidad de fangos residuales. Por lo tanto, es un método eficaz para resolver la escasez de fuentes de carbono (Guo et al., 2017; J. Liu et al., 2017).

Se han descrito varios esquemas de operación para la producción de AGV a partir de la fermentación de fangos primarios (Teichgräber, 2000). Una de las configuraciones más simples para la fermentación y elutriación de fangos primarios consiste en permitir que los sólidos de fangos primarios sedimentados se acumulen en el fondo de los tanques de sedimentación primarios y reciclar parcialmente este fango para elutrir los productos de fermentación del fango. Cuando no se puede producir la concentración de AGV requerida en el propio tanque de sedimentación, se puede utilizar una unidad de fermentación separada para aumentar la producción de AGV. En este caso, el fango sedimentado se conduce a la unidad de fermentación y el fango fermentado se devuelve al sedimentador primario para elutrir los AGV con las aguas residuales afluentes.

En cuanto a los factores que afectan la producción de AGV a partir de la fermentación del fango primario, se incluyen parámetros operativos como el tiempo de retención celular (TRC), el tiempo de

retención hidráulico (TRH), el pH, la temperatura, etc (Yuan et al., 2009). Perot et al., 1988 llevaron a cabo un experimento en el que se investigaron los efectos del pH, la temperatura y la velocidad de agitación con respecto a la producción de AGV. Concluyeron que las condiciones óptimas de hidrólisis parecían ser un pH de 6,8 a una temperatura de 50°C y una velocidad de agitación de 545 rpm. Bouzas et al., 2002 informaron que mayores concentraciones de sólidos volátiles totales resultaron en una mayor producción de AGV, pero que un TRC por encima de 6 días no mejoró significativamente los rendimientos de AGV. No obstante, también se observó que un TRC menor a 4 días disminuía drásticamente la producción de AGV.

Aunque la fermentación de fangos primarios está bien establecida en todo el mundo (Bouzas et al., 2007; Chanona et al., 2006), el proceso real puede ser difícil de controlar y la confiabilidad de la generación de AGV a menudo no existe (Yuan et al., 2010).

El único otro sustrato disponible para la producción de AGV dentro de una planta de tratamiento de aguas residuales es el **fango secundario** (fango biológico, también conocido como fango activado). En este sentido, la **fermentación** de estos fangos para **producir DQO residual como complemento a la fermentación de fango primario** es una oportunidad.

fangoEl fango primario contiene altas concentraciones de polímeros orgánicos fácilmente biodegradables (proteínas, lípidos, carbohidratos), lo que permite tiempos cortos de hidrólisis y fermentación. El fango biológico, por otro lado, contiene principalmente masa bacteriana. Por lo tanto, la lisis celular en este caso es el paso limitante de la velocidad de hidrólisis (Turoviskiy y Mathai, 2006). Se espera que la fermentación del fango activo libere P y N en la fase líquida, como se demostró durante la fermentación de fangos primarios co-espesados con fangos activados por Danesh y Oleszkiewicz (1997) y McIntosh y Oleszkiewicz (1997).

Investigaciones como la de (Yuan et al., 2010) han demostrado que la fermentación de fango activo tenía las siguientes ventajas: (1) proporcionaba carbono interno para la eliminación de nutrientes biológicos y (2) los nutrientes liberados durante la fermentación podían recuperarse en una forma útil como la estruvita. En el estudio realizado por (Yuan et al., 2009), se recuperaron

aproximadamente el 92 % del P y el 72 % del N-NH₄, respectivamente. La liberación de nutrientes y la posterior recuperación de estos, a partir de la fermentación del fango activado, podrían ser una ventaja única de la fermentación de este tipo de fangos residuales frente a la fermentación de fangos primarios como fuente de AGV en un proceso EBPR.

Además, la fermentación de fango activo disminuye la masa del exceso de fango generado, lo que reduce los costos operativos. Andreassen, 1997 y Ucisik & Henze, 2008 demostraron que, en comparación con el fango primario, el fango activo tiene una biodegradabilidad mucho más lenta, lo que se indicó por una menor relación entre la DQO soluble y la DQO total resultante. Skalsky & Daigger, 1995 observaron que la mezcla de fango primario fermentado y fango activo dio como resultado una liberación de una cantidad significativa de P (50% del P total del fango activo). Este P liberado podría recuperarse en forma de estruvita en un cristizador.

En el estudio de Yuan et al., 2010 se comparó la fermentación de un fango primario, fango activado y de la mezcla de ambos (fango mixto). Se observó que el fango primario generó una DQO soluble significativamente mayor que el fango activado en ambas plantas de tratamiento. Esto es debido al mayor contenido en material rápidamente biodegradable presente en el fango primario. Por su parte, las concentraciones de P-PO₄ y el N-NH₄ liberados del fango activo durante la fermentación fueron mucho mayores que las del fango primario. Esto está relacionado con el menor contenido en N y P que presenta el fango primario con respecto al fango activado. Por su parte, este último se compone principalmente de biomasa, donde el N y el P son los componentes principales de las células bacterianas. La fermentación provocó la lisis de las células, lo que dio como resultado la liberación de N y P de la célula a la fase líquida. A diferencia del fango activado, el fango primario contiene principalmente polímeros orgánicos, como proteínas, carbohidratos y lípidos en los que el contenido de P es bastante bajo.

Estudios previos (Martí et al., 2008; Barat et al., 2009) han demostrado que el espesamiento de fangos mixtos combinado con una corriente de elutriación de alto caudal logra reducir la precipitación de P en el digestor.

En el caso de Marti et al., 2008, se realizó un estudio en el que los fangos mixtos se recircularon al espesador gravitacional de la EDAR. En esta unidad los compuestos solubles presentes en los fangos mixtos (incluido el $P-PO_4$) se lavaron y se extrajeron con el sobrenadante del espesador. El espesamiento de fangos mixtos combinado con una corriente de elutriación de alto caudal redujo la precipitación de P en el digestor en un 46%, respecto a la configuración de espesamiento de fangos por separado (práctica habitual en EDAR). Además, en esta configuración, el 68% del P soluble del sistema se consideraba disponible para un posible proceso de recuperación de P por cristalización.

Por su parte, Barat et al., 2009 propuso un cambio en la configuración de la línea de fangos de una EDAR de Tarragona, con el objetivo de minimizar la precipitación de P durante la digestión anaerobia y obtener una corriente de P enriquecida para recuperar. Para ello, Barat et al., 2009 realizaron simulaciones en DESASS para reproducir la modificación en la configuración de la EDAR de estudio. En dichas simulaciones, se modeló la mezcla del fango primario, caracterizado por una alta concentración de AGV, con el fango secundario, enriquecido con bacterias PAO y, por tanto, con polifosfato interno. Las condiciones anaerobias y la presencia de AGV simuladas indujeron la liberación del polifosfato de las PAO en forma de fosfato soluble. Esta liberación de fosfato tuvo lugar en la cámara de mezcla y en el fondo del espesador gravitacional. La elutriación del $P-PO_4$, $N-NH_4$ y cationes metálicos se llevó a cabo mediante la recirculación del fango mezclado espesado desde el fondo del espesador hasta la zona de fangos de entrada. Esta elutriación permitió minimizar la carga de estos compuestos en el afluente del digestor y obtener una corriente sobrenadante enriquecida en estos componentes. Los resultados obtenidos a partir de las simulaciones indicaron porcentajes de recuperación del P total del 23%.

Cabe resaltar que esta **nueva configuración de la línea de fangos implica ciertas limitaciones**. Esto se analiza en profundidad en el estudio realizado por (Martí et al., 2017). En dicho trabajo, llevado a cabo en la EDAR de Calahorra (La Rioja, España), se realizaron simulaciones en DESASS para analizar los parámetros de operación del proceso que deben ser optimizados, concretamente el **caudal de elutriación**, desde la cámara de mezcla al espesador primario, y el **caudal de digestión**. El caudal de elutriación se varió de 25 a 390 $m^3 \cdot d^{-1}$ y el caudal de digestión de 45 a 105 $m^3 \cdot d^{-1}$. Estos rangos se seleccionaron de acuerdo a la capacidad de las bombas disponibles en la EDAR. En las simulaciones

en DESASS realizadas se observó que, cuanto mayor es el caudal de elutriación y menor el caudal de digestión, mayor es la concentración de P en el sobrenadante del espesador, aumentando así la recuperación potencial de P. Sin embargo, estos caudales de elutriación y digestión están limitados por la capacidad del espesador para retener sólidos y por la concentración de sólidos en el fango espesado que entra al digestor anaeróbico. La concentración de SS en el sobrenadante del espesador primario es un buen indicador de la altura del manto de fangos. Cuando la concentración de SS aumenta bruscamente indica que la altura del manto de fangos alcanza su valor máximo perdiendo sólidos con el efluente.

Por otro lado, se observó que los altos caudales de elutriación (superiores a $250 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$) combinados con bajos caudales de digestión (inferiores a $55 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$) elevan el manto de fangos hasta la sobrecarga final del espesador primario. La concentración de sólidos del fango espesado es otro cuello de botella en el sistema propuesto. Esta concentración tiene un límite relacionado con la concentración máxima de sólidos a la que puede funcionar el sistema de agitación del digestor. La concentración de sólidos en el fango espesado aumenta drásticamente cuando el caudal de digestión disminuye. Por lo tanto, aunque los caudales de digestión bajos aumentan la concentración de fosfato en el efluente del espesador gravitacional, este caudal de digestión debe limitarse de acuerdo con la capacidad de mezcla del digestor (es decir, máximo $25 \text{ g SS} \cdot \text{L}^{-1}$ en la EDAR de Calahorra). Por lo tanto, el caudal de digestión no debe disminuir por debajo de $70 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ para evitar una concentración de sólidos en el fango espesado superior a $50 \text{ g SS} \cdot \text{L}^{-1}$ (teniendo en cuenta que la reducción media de SS en el digestor de Calahorra es de alrededor del 50%). A este caudal de digestión, el caudal de elutriación no debe superar los $150 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ para evitar SS en el sobrenadante del espesador superiores a $1000 \text{ mg SS} \cdot \text{L}^{-1}$.

Por lo tanto, el caudal de elutriación desde la cámara de mezcla hasta el espesador primario, el caudal de digestión y la altura del manto de fangos del espesador primario fueron los parámetros operativos clave y los valores optimizados estuvieron entre 70 y $80 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, 90 - $100 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ y $1,4$ - $1,5 \text{ m}$, respectivamente.

Esta modificación en la línea de fangos permite incrementar la concentración de fosfato en el sobrenadante del espesador de gravedad de $38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.2.3.1.2. COMBINACIÓN DE SISTEMAS DE ELUTRIACIÓN Y RECUPERACIÓN DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE P DE LOS FANGOS DE EDAR

En términos del balance global de P, en una EDAR con EBPR, un sistema de recuperación de P mediante elutriación y posterior cristalización del P extraído permite pasar de una recuperación del 9% (sin elutriación) a una recuperación del 16% del P total afluente a la EDAR (Marti et al., 2010; Martí et al., 2017).

No obstante, estos sistemas de recuperación son ineficientes en la recuperación del P orgánico, asociado fundamentalmente a constituyentes celulares de la biomasa de los fangos secundarios o a la materia orgánica contenida en los fangos primarios. Este P orgánico debe ser transformado a $P-PO_4$ para poder ser recuperado en procesos posteriores de cristalización. Dicha transformación, con los sistemas de extracción/elutriación planteados actualmente, no puede tener lugar de forma efectiva antes de la etapa de digestión, teniendo lugar dentro de los digestores donde acaba precipitando gran parte del P orgánico liberado.

El P liberado en el digestor es el resultado de la degradación de la materia orgánica (el **P en la materia orgánica representa el 58% del P_T** cargado en la línea de tratamiento de fangos) y de la hidrólisis del Poly-P (el P en el Poli-P representa el 42% del P_T cargado en la línea de tratamiento de fangos). El proceso de degradación de la materia orgánica que tiene lugar en el digestor anaerobio es consecuencia de la estabilización de los fangos y no se puede reducir para minimizar la precipitación de P. Sin embargo, el P liberado del Poly-P en el digestor se puede reducir mejorando su liberación y separación antes de la digestión. Por ello, en el apartado anterior se propone la reducción de la carga de fosfato en la digestión anaerobia, para maximizar la liberación y una mayor separación de P antes de la digestión. No obstante, **teniéndose en cuenta el porcentaje que representa el P orgánico del P_T , aún existe un margen importante de recuperación de P en EDAR** debido a que el P orgánico es potencialmente aprovechable (Martí et al., 2017).

1.2.3.2. PRETRATAMIENTOS APLICADOS A LOS FANGOS DE EDAR

La mayor parte del P presente en el fango activado residual se encuentra dentro de las células microbianas. Las paredes celulares de los microorganismos son estructuras estables que evitan la ruptura celular, lo que prolonga el tiempo de tratamiento para la DA. Por lo tanto, el **pretratamiento de los fangos de EDAR puede beneficiar** la ruptura celular y la hidrólisis, mejorando así la eficiencia de la **digestión anaerobia**.

Según las características técnicas, los métodos de pretratamiento de fangos pueden dividirse en tratamientos físicos, químicos y biológicos. Entre las tecnologías de tratamiento físico, la hidrólisis térmica ha sido ampliamente industrializada (Z. Wang et al., 2009). Como pretratamientos químicos destacan los de oxidación química, como el tratamiento electroquímico y la oxidación con ozono. Por último, como tecnología de pretratamiento biológico sobresale la hidrólisis enzimática, que puede mejorar la digestión de los fangos, simplificar la operación y generar menos contaminación ambiental (Rashed et al., 2010). Para la selección de alguna de estas opciones será necesario analizar cómo se combinan los beneficios económicos y ambientales que aporta cada técnica, en cada situación específica.

Actualmente, la investigación y aplicación de los métodos de pretratamiento de fangos se centran en reducir el volumen de los fangos o recuperar fuentes de carbono mediante la desagregación de estos (Chi et al., 2018; X. Li et al., 2016; L. Yu et al., 2018). **Pocos estudios han investigado la liberación y recuperación de** nutrientes, como el **P**, a partir del hidrolizado de fangos después de los pretratamientos.

En el caso concreto de la hidrólisis enzimática, se ha observado que es beneficiosa para mejorar la digestión de fangos y, por lo tanto, aumentar significativamente la producción de metano (Agabo-García et al., 2019; Avila et al., 2021; Bahreini et al., 2020). En el estudio de Avila et al., 2021, se observó que los pretratamientos con enzimas sobre biomasa algal incrementaron la producción de metano hasta 5,3 veces en comparación con la biomasa sin tratar, mostrando un aumento en la eficiencia de solubilización de microalgas y su integración con fangos activados como co-sustrato.

En el estudio de Bahreini et al., 2020 se subrayó que el uso de celulasas y diferentes condiciones de tiempo de retención y temperatura mejoraron la producción de AGV y solubilización en fangos ricos en celulosa, siendo el pretratamiento más efectivo a 35°C y con un 1% de enzima añadido.

Finalmente, en el estudio realizado por Agabo-García et al., 2019 se destacó que la aplicación de enzimas comerciales como proteasas y el uso de bacterias como *Bacillus licheniformis* durante la fermentación in situ resultaron en un aumento significativo en la producción de biogás, logrando un volumen de metano hasta 5,77 veces superior al control.

En conjunto, estos **estudios confirman la eficacia de los pretratamientos enzimáticos para maximizar la conversión de materia orgánica** en energía renovable.

A diferencia de otros métodos de pretratamiento de fangos, como la oxidación con ozono, la operación y los dispositivos requeridos para la hidrólisis enzimática son relativamente simples y ecológicos (X. Liu et al., 2020). Por otro lado, aunque el pretratamiento con enzimas puede ser costoso y requerir más tiempo en comparación con otros métodos físico-químicos, los avances recientes en la producción industrial de enzimas, junto con el aumento de costos en tecnologías alternativas, están posicionando al pretratamiento enzimático como una opción cada vez más viable en ciertos contextos (Lee et al., 2014).

Por su parte, X. Liu et al., 2020 también evaluaron el desempeño de la hidrólisis enzimática en la liberación de P, haciendo uso de enzimas proteasas. En este estudio, se eligieron técnicas de tratamiento físico, químico y biológico, específicamente hidrólisis térmica, hidrólisis enzimática e hidrólisis con ácido nitroso libre, para el tratamiento de fangos de EDAR. El P-PO₄ en el hidrolizado después de estos 3 tratamientos estuvo principalmente afectado por el valor de pH y la distribución del P inorgánico (alrededor del 48 % del P_T en el fango). La concentración de P-PO₄ liberado en el hidrolizado después de la hidrólisis enzimática fue de 787,47 ± 3.03 mg L⁻¹ (alrededor del 55 % del P_T en el fango), aproximadamente 200 mg L⁻¹ más alta que las concentraciones obtenidas después de los tratamientos de hidrólisis térmica y con ácido nitroso libre. Así mismo, el **tratamiento de hidrólisis enzimática** condujo inicialmente a una **reducción del pH del fango**, lo que **favoreció la**

liberación de P inorgánico. El aumento de la solubilidad del P puede estar relacionado con la disolución de los compuestos de Ca-P y Mg-P bajo condiciones ácidas (Agabo-García et al., 2019; Avila et al., 2021; Bahreini et al., 2020; X. Liu et al., 2020). Al mismo tiempo, la hidrólisis enzimática es beneficiosa para la descomposición del fango y promueve la liberación de P intracelular después de la lisis celular (J.D. Keasling et al., 1997).

La hidrólisis enzimática proporciona una herramienta poderosa para evaluar las formas biodisponibles de P orgánico en residuos biodegradables (Bünemann, 2008; Darch et al., 2016; Turner et al., 2003). Además, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de P-31 (31P NMR) proporciona información cuantitativa sobre el P a nivel estructural y molecular (L. Wang et al., 2019). La integración de múltiples técnicas complementarias, incluyendo métodos de extracción química secuencial, hidrólisis enzimática y 31P NMR, resulta confiable para identificar con precisión las formas de P y rastrear su transformación y biodisponibilidad.

Aunque estos métodos se han utilizado en los campos del control de la contaminación del agua y la evaluación de nutrientes del suelo (Bünemann, 2008; Y. Wang et al., 2023; Y. Zhu et al., 2013), en el caso de los residuos orgánicos la investigación se ha basado principalmente en el método tradicional de extracción química secuencial, con una exploración limitada de la hidrólisis enzimática y 31P NMR.

En el estudio de (Ran et al., 2025), se investigaron las caracterizaciones del P en siete tipos de residuos orgánicos, incluidos estiércol de ganado, fangos de depuradora, residuos alimentarios y paja de cultivos. Se empleó un enfoque combinado que utiliza extracción química secuencial, hidrólisis enzimática y resonancia magnética nuclear de P-31 (31P NMR) para elucidar información sobre las formas de P en estos residuos.

En este estudio se observó que el P en forma de fitato, compuesto principalmente de ácido fúlvico y fosfatos de inositol unidos a proteínas (Y. Zhu et al., 2013), exhibe una disponibilidad deficiente para las plantas debido a la fuerte adsorción en óxidos de Fe/Al y la interacción con sustancias húmicas (Borie, 1981). El fitato se forma principalmente en las plantas y existe en granos y semillas

oleaginosas. En el caso del fango de EDAR, tal y como puede observarse en la Figura 13, se obtiene un porcentaje de P similar al fitato de entre un 25-30% (Ran et al., 2025).

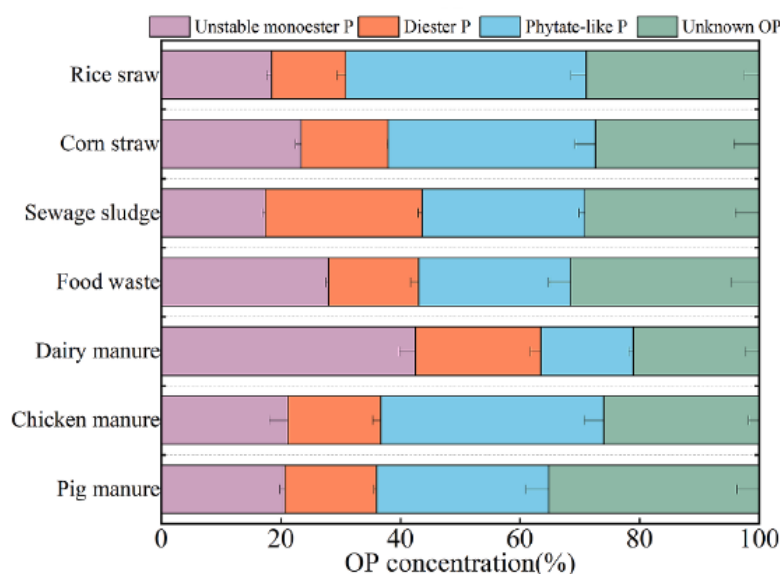


Figura 13. Contenido de diferentes especies de P orgánico en los residuos orgánicos, obtenidos mediante hidrólisis enzimática. (Fuente: Ran et al., 2025).

1.2.3.3. ENZIMAS HIDROLÍTICAS

La hidrólisis enzimática de compuestos orgánicos complejos es el paso principal y, a menudo, el que limita la velocidad en los procesos de tratamiento aeróbico y anaeróbico de aguas residuales (Sangave & Pandit, 2006). Los compuestos orgánicos complejos, como las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y sus conjugados o derivados en las aguas residuales, son hidrolizados inicialmente por enzimas extracelulares producidas por diferentes poblaciones microbianas.

Así, una alternativa a los pretratamientos energéticamente costosos aplicados más habitualmente para incrementar la biodegradabilidad anaerobia de la materia orgánica compleja presente en los fangos de EDAR es **promover la hidrólisis enzimática** de los biopolímeros que conforman la pared celular de los sustratos difíciles de biodegradar.

Los pretratamientos hidrolíticos se llevan a cabo mediante la adición de complejos enzimáticos comerciales, cuya eficacia depende de: la dosis, la temperatura, el tiempo de exposición y el pH, debiendo optimizarse estos parámetros para cada sustrato (Sangave & Pandit, 2006).

Las enzimas presentan un gran potencial como catalizadores y son una alternativa para la química sintética en el campo de las biotransformaciones, las cuales son reacciones químicas llevadas a cabo por microorganismos o catalizadas por enzimas dando lugar a la transformación selectiva de un sustrato (Burgess & Pletschke, 2018).

Las enzimas hidrolíticas, también denominadas hidrolasas, son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis. La reacción general catalizada puede representarse como:



El nombre de las hidrolasas se forma a partir del sustrato seguido de "hidrolasa". Ahora bien, el nombre común o recomendado de estas enzimas se forma con el nombre del sustrato seguido del sufijo "asa"; es decir, en nombres como ureasa, fosfatasa, amilasa, etc., se entiende que se trata de enzimas hidrolíticas.

Aplicación de enzimas hidrolíticas en los fangos de EDAR

Debido a la ya comentada resistencia que presenta el **ácido fítico** a ser degradado de forma rápida y a que se trata de un componente presente en las aguas residuales y, por tanto, en los fangos de EDAR, en este trabajo **se evaluará el incremento de degradabilidad de estos compuestos mediante la acción de enzimas hidrolíticas.**

En los últimos años, la actividad enzimática y sus funciones relacionadas con el proceso de eliminación biológica de P han recibido poca atención. No obstante, se conoce que la fosfatasa, correspondiente al grupo de enzimas hidrolíticas, **es capaz de provocar la liberación de P-PO₄ a partir de formas de P orgánicamente ligadas**, el cual puede ser asimilado por microorganismos y plantas.

Por estas razones, las actividades de la fosfatasa y las fracciones de P en diferentes ambientes, como en suelos (Chen, 2003; Wasaki et al., 2003) y sedimentos marinos, de ríos y lagos (Hoppe, 2003), han sido ampliamente reportadas. Sin embargo, **pocos estudios han considerado las actividades de fosfatasa en el fango activado** (Anupama et al., 2008; Goel et al., s. f.). Además, y hasta donde se conoce, no se ha informado sobre la relación entre la fosfatasa y las fracciones de P en aguas residuales y fangos de EDAR.

Un **mejor entendimiento de las fracciones de P y las actividades de fosfatasa en el fango puede ser beneficioso** no solo **para la recuperación de P en el tratamiento biológico de aguas residuales**, sino también para los depósitos posteriores de fangos residuales en suelos y sedimentos.

1.2.3.3.1. ENZIMAS FOSFATASAS

La fosfatasa existe como fosfomonoesterasa alcalina y ácida (*Enzymatic Comission Number* (EC) 3.1.3.1 y EC 3.1.3.2, respectivamente) y como fosfodiesterasa (EC 3.1.4). Es la única responsable del ciclo del P en el medio ambiente (Criquet et al., 2004). Tanto la fosfatasa ácida como la alcalina son producidas por bacterias, hongos y levaduras y estas enzimas difieren en su reacción en diferentes sustratos (Hollander, 1971).

Existen algunos estudios que han tenido en cuenta la actividad de la fosfatasa en fangos activados (Goel et al., 1998; Kloeke, 1999; Y. Li & Chróst, 2006), mientras que su actividad en reactores anaerobios rara vez se informa (Bull, 1984; Whiteley et al., 2002).

En el estudio de Xie et al., 2011 se analizaron las actividades de fosfatasa alcalina en diferentes muestras de fango obtenidas de 5 plantas de tratamiento de aguas residuales: una a escala piloto (en inglés: *lab scale*, LS), 2 EDAR urbanas (Sibao, SB y Qige, QG) y 2 EDAR industriales (Hongxi, HX y Gaoqiao, GQ).

Como se demuestra en la Figura 14, la actividad enzimática de la fosfatasa (en inglés: *alkaline phosphatase activity*, APA) en el fango de LS fue de aproximadamente $113,5 \pm 7,2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$. El

promedio de la APA de cada proceso biológico osciló entre $111,6 \pm 4,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ y $123,1 \pm 5,5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas y de $122,3 \pm 6,1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ a $145,1 \pm 6,0 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para las plantas industriales.

Los resultados del estudio mostraron que, en las muestras de lodo activado con mayores APA (HX y GQ), la concentración de P_T era relativamente más baja, pero la proporción de P orgánico sobre el total era mayor (ver Tabla 2). Esta tendencia fue especialmente evidente en los lodos provenientes de plantas tratadas con efluente industrial, donde, a pesar de la menor concentración de P total en comparación con lodos de origen doméstico, el P orgánico representó entre el 25 % y el 52 % del P_T , frente al 14 %–21 % observado en los lodos domésticos.

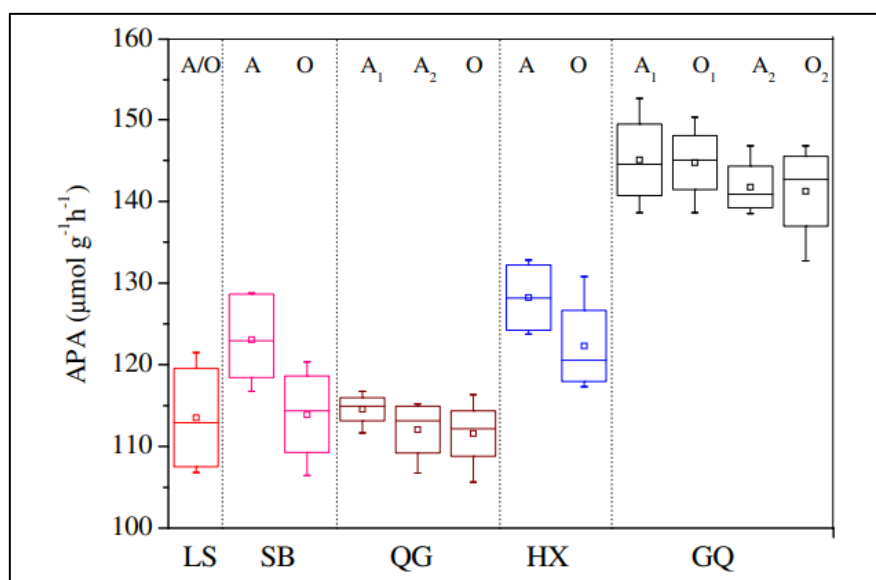


Figura 14. Análisis estudio Xie et al., 2011. Procesos de tratamiento biológico de los influentes en cada caso analizado: LS: Anaerobio-aerobio (A/O); SB: Anóxico-Aerobio (A O), QG: Anaerobio-Anóxico-Aerobio (A₁ A₂ O), HX: Anóxico-Aerobio (A O); GQ: Anóxico-Aerobio-Anóxico-Aerobio (A₁ O₁ A₂ O₂).

Las actividades de fosfatasa alcalina pueden ser un indicador del potencial de hidrólisis de P orgánico en el fango. Muchos estudios han reportado la inhibición de las actividades de fosfatasa por P inorgánico en suelos (CRIQUET et al., 2007; Juma & Tabatabai, 1977; Oshima et al., 1996). Esta inhibición también se ha observado en fango anaerobio Anupama et al., 2008 y en fango activado (Xie et al., 2010). En esta investigación, también se encontró una clara inhibición de la actividad

enzimática de la fosfatasa por P inorgánico en el fango alimentado con diferentes concentraciones de P. Las mayores actividades de fosfatasa en el fango también pueden deberse a un P inorgánico más bajo en el fango (ver Tabla 2 y Figura 14). En conjunto, el aumento de las actividades de fosfatasa en el fango está relacionado con el agotamiento de las formas de P orgánico en los fangos, al mismo tiempo que también sugiere que hay una menor concentración de P inorgánico en estos.

Tabla 2. Resultados obtenidos en el fango activado (unidades en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). (Adaptado de Xie et al., 2011)

Planta	Etapa del proceso	P_T	P inorgánico	P orgánico	P orgánico/ P_T
		$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	%
LS	-	20.4 ± 0.6	17.6 ± 0.9	2.2 ± 0.2	11%
SB	Anóxico	16.3 ± 0.5	13.1 ± 0.4	2.8 ± 0.1	17%
	Aerobio	16.9 ± 0.3	12.8 ± 0.9	3.6 ± 0.2	21%
QG	Anaerobio	17.3 ± 1.1	15.0 ± 0.5	2.4 ± 0.1	14%
	Anóxico	17.0 ± 0.5	14.4 ± 0.8	2.5 ± 0.3	15%
	Aerobio	16.2 ± 0.8	13.3 ± 0.6	3.3 ± 0.2	20%
HX	Anóxico	2.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.2	52%
	Aerobio	3.9 ± 0.3	2.2 ± 0.3	1.7 ± 0.2	44%
GQ	Anóxico 1	4.5 ± 0.3	3.2 ± 0.2	1.4 ± 0.1	31%
	Aerobio 1	5.1 ± 0.2	3.5 ± 0.3	1.6 ± 0.1	31%
	Anóxico 2	6.3 ± 0.4	4.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2	25%
	Aerobio 2	5.3 ± 0.3	3.4 ± 0.2	1.6 ± 0.2	30%

Hasta ahora, los estudios que se han elaborado sobre la relación entre la actividad enzimática y la eliminación de contaminantes durante la depuración de aguas residuales han presentado resultados ambiguos. En el estudio realizado por Nybroe et al., 1992, la actividad de las enzimas hidrolíticas en el fango activado se vio afectada por la composición del influente; sin embargo, **no se encontraron correlaciones obvias entre las actividades enzimáticas y parámetros específicos del proceso.** (Y. Li & Chróst, 2006) reportaron que no se halló una relación significativa entre las actividades enzimáticas, incluyendo la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, y las concentraciones de

carbono orgánico disuelto en reactores aeróbicos. En cambio, muchos informes mostraron que las **actividades de fosfatasa** estaban **principalmente influenciadas por la biomasa en el fango** (Anupama et al., 2008; Y. Li & Chróst, 2006; Molina-Muñoz et al., 2010).

Las fitasas pertenecen al grupo de fosfatasas, capaces de hidrolizar los fitatos. Estas enzimas han llamado la atención ya que son capaces de generar P disponible. Se agrupan de acuerdo con la posición específica del grupo éster fosfato en el que se inicia la hidrólisis y se utilizan principalmente como aditivo en alimentos de animales (para elevar el valor nutricional) y para la biorremediación de suelos y aguas en la remoción de P orgánico (de Ruesga Valdivia, s. f.).

Las fitasas (myo-inositol hexakisfosfato fosfohidrolasas, EC 3.1.3.8 y 3.1.3.26) son producidas por plantas y microorganismos. Estas enzimas hidrolizan el fitato (myo-inositol hexakisfosfato) en una formación escalonada de mio-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- y monofosfato para liberar fosfato inorgánico. Las fitasas disponibles en el mercado han sido ampliamente utilizadas en la investigación agrícola y medioambiental.

Por ejemplo, tal y como se ha comentado previamente, estas enzimas pueden añadirse a los piensos para mejorar la biodisponibilidad del fosfato en animales monogástricos. Las fitasas podrían utilizarse como agente biológico respetuoso con el medio ambiente en la industria para hidrolizar el fitato vegetal. Así mismo, es posible emplear las fitasas disponibles en el mercado para caracterizar las formas orgánicas de P en muestras ambientales, como suelos y estiércol animal, entre otros.

De forma global, la fitasa es capaz de hidrolizar el ácido fítico, produciendo P inorgánico, además de una serie de ésteres fosfóricos del myo-inositol (Canquil et al., 2008).

La aplicación de la enzima fitasa, que cataliza la hidrólisis del fitato (o ácido fítico) presenta un potencial prometedor en plantas de tratamiento biológico de aguas residuales (EDAR). Una de las principales utilidades de la fitasa en EDAR, que incorporan eliminación biológica de P, radica en el incremento del porcentaje de fosfato que puede recuperarse de este proceso biológico. Al descomponer el fitato, la fitasa libera P, haciéndolo más accesible para la absorción biológica y la

precipitación como compuestos insolubles. Este proceso puede mejorar la eficiencia de la eliminación de P en las EDAR, especialmente en sistemas de eliminación biológica de nutrientes.

La utilización de fitasa en EDAR puede conducir a una mayor recuperación de P de las aguas residuales, siempre teniéndose en cuenta la necesidad de ajustar y optimizar los procesos de recuperación de este nutriente.

1.2.3.3.2. ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Los pretratamientos de biomasa lignocelulósica, incluyendo restos de cultivos energéticos que, como ya se ha mencionado previamente, pueden estar presentes en el fango de EDAR, han sido ampliamente investigados a escala de laboratorio. En los últimos años, el método biológico basado en el uso de microorganismos y enzimas bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas se ha consolidado como una estrategia prometedora para el pretratamiento de este tipo de biomasa (Liang et al., 2021).

En particular, los pretratamientos enzimáticos han demostrado un impacto significativo y han sido evaluados principalmente mediante ensayos de potencial bioquímico de metano (Carrere et al., 2016), destacando el empleo de enzimas hidrolíticas, en concreto las celulolíticas, por su capacidad para incrementar la producción de biogás y mejorar la hidrolización de la fracción orgánica del fango (Bahreini et al., 2020; Ding et al., 2017). Estas enzimas, al actuar sobre componentes estructurales vegetales como celulosa y hemicelulosa, no solo mejoran la digestibilidad de la biomasa, sino que también favorecen la liberación de compuestos intracelulares de interés.

En este contexto, la liberación de P a partir de residuos vegetales presentes en el fango (como fragmentos de cereales) se encuentra estrechamente relacionada con la ruptura de las estructuras complejas de la pared celular mediante la acción de enzimas celulolíticas. Esto es debido a que la acción hidrolítica de las enzimas celulolíticas sobre los restos vegetales resultan relevantes para la movilización de P, ya que este suele encontrarse ligado estructuralmente a la matriz de la pared celular (Datta, 2024).

En consecuencia, lo que se espera en este trabajo es aprovechar la acción de enzimas celulolíticas para romper la pared celular de los restos vegetales presentes en el fango y así liberar el P orgánico que permanece inaccesible, facilitando su transformación en $P-PO_4$ y su posterior recuperación.

1.2.3.4. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

A pesar de las ventajas potenciales del uso de enzimas hidrolíticas para favorecer la recuperación de parte del P orgánico en los fangos de EDAR, su aplicación enfrenta diversos desafíos que limitan su eficacia en condiciones reales. Entre los principales obstáculos se encuentran el alto costo asociado a su extracción y purificación, la inestabilidad estructural de las enzimas una vez aisladas de sus entornos naturales, y su elevada sensibilidad a desviaciones de las condiciones operativas óptimas, que suelen ser muy estrechas. Estos factores contribuyen a una vida útil limitada de las enzimas en aplicaciones prácticas, dificultando su integración en los procesos de tratamiento existentes. Además, a diferencia de los catalizadores químicos heterogéneos convencionales, la mayoría de las enzimas operan disueltas en agua en sistemas de catálisis homogénea, lo que implica que contaminan el producto y, por lo general, no pueden ser recuperadas en forma activa de las mezclas de reacción para su reutilización (Krajewska, 2004).

En este contexto, en el presente estudio se valora complementar el uso de enzimas hidrolíticas para la recuperación de P de la fracción orgánica, con técnicas de encapsulación enzimática, que permitan optimizar el uso de estas enzimas y evaluar su efectividad en aplicaciones reales de tratamiento de aguas residuales.

Se han propuesto varios métodos para superar estas limitaciones, siendo uno de los más exitosos la **inmovilización de enzimas** (Tischer & Wedekind, 1999; van de Velde et al., 2002). La inmovilización se logra fijando las enzimas a soportes sólidos o dentro de ellos, lo que da lugar a sistemas enzimáticos inmovilizados heterogéneos. Al imitar el modo natural de funcionamiento en las células vivas, donde las enzimas generalmente están unidas a las membranas celulares, estos sistemas estabilizan la estructura de las enzimas y, por ende, su actividad (Krajewska, 2004). Por lo tanto, en comparación con las enzimas libres en solución, las enzimas inmovilizadas son más robustas y resistentes a los cambios ambientales. Más importante aún, la heterogeneidad de los sistemas

enzimáticos inmovilizados permite una fácil recuperación tanto de las enzimas como del producto, la reutilización múltiple de las enzimas, la operación continua de los procesos enzimáticos, así como una mayor variedad en el diseño de biorreactores (Tischer & Wedekind, 1999).

Las enzimas pueden ser inmovilizadas mediante una variedad de **métodos**, los cuales pueden clasificarse ampliamente en **físicos**, donde existen interacciones débiles entre el soporte y la enzima, y **químicos**, donde se forman enlaces covalentes con la enzima (Tischer & Wedekind, 1999).

Entre los métodos físicos de inmovilización se incluyen:

1. Confinamiento de una enzima dentro de un reactor de membrana
2. Adsorción (física, iónica) sobre una matriz insoluble en agua
3. Inclusión (o atrapamiento en gel)
4. Microencapsulación con una membrana sólida
5. Microencapsulación con una membrana líquida
6. Formación de películas enzimáticas de Langmuir-Blodgett

Los métodos químicos de inmovilización incluyen:

1. Unión covalente a una matriz insoluble en agua
2. Entrecruzamiento con el uso de un reactivo multifuncional de bajo peso molecular
3. Co-entrecruzamiento (crosslinking) con otras sustancias neutrales, como proteínas.

Se han ideado numerosos otros métodos que son combinaciones de los mencionados o específicos y originales de un soporte o enzima dados. Sin embargo, no existe un único método ni un soporte que sea el mejor para todas las enzimas y sus aplicaciones. Esto se debe a las características químicas y composiciones tan diferentes de las enzimas, las diferentes propiedades de los sustratos y productos, y los distintos usos a los que se puede aplicar el producto. Además, todos los métodos presentan ventajas y desventajas. La adsorción es simple, económica y efectiva, pero frecuentemente es reversible; la unión covalente y el *crosslinking* son efectivos y duraderos, pero costosos y pueden empeorar fácilmente el rendimiento de la enzima. Por último, en el caso del confinamiento en reactor

de membrana, atrapamiento y microencapsulación, los problemas difusionales son inherentes. En consecuencia, como regla general, las condiciones óptimas de inmovilización para una determinada enzima y su aplicación se deben buscar de forma empírica mediante un proceso de prueba y error, de manera que se asegure la máxima retención posible de la actividad de la enzima, su estabilidad operativa y su durabilidad (Krajewska, 2004).

A pesar de sus ventajas, la inmovilización conlleva una serie de efectos que empeoran el rendimiento de las enzimas (Tischer & Wedekind, 1999). En comparación con la enzima libre, la enzima inmovilizada generalmente tiene su actividad reducida. Esto es resultado de los cambios estructurales introducidos en la enzima por el procedimiento de inmovilización aplicado y de la creación de un microambiente en el que la enzima actúa, diferente de la solución en la que actuaría la enzima libre.

Para su implementación en un proceso comercial, deben sopesarse todos los efectos beneficiosos y perjudiciales, teniendo en cuenta todos los aspectos relevantes, incluidos los de salud y medioambientales, además de la viabilidad económica. Hasta la fecha, varios procesos basados en enzimas inmovilizadas han demostrado ser económicos y se han implementado a mayor escala, principalmente en la industria alimentaria, donde reemplazan procesos catalizados por enzimas libres, y en la fabricación de productos químicos finos y farmacéuticos especializados (Tischer & Wedekind, 1999; van de Velde et al., 2002).

1.2.3.4.1. ENCAPSULACIÓN DE ENZIMAS CON BASE EN CITOSANO

Las propiedades de las enzimas inmovilizadas están determinadas por las propiedades tanto de la enzima como del material de soporte (Kurita, 2001; Tischer & Wedekind, 1999). La interacción entre ambos confiere a una enzima inmovilizada propiedades físico-químicas y cinéticas específicas que pueden ser decisivas para su aplicación práctica. Por lo tanto, un soporte elegido de manera adecuada puede mejorar significativamente el rendimiento operativo del sistema inmovilizado. Aunque se reconoce que no existe un soporte universal para todas las enzimas y sus aplicaciones, una serie de características deseables deben ser comunes a cualquier material considerado para la

inmovilización de enzimas. Estas incluyen: alta afinidad por las proteínas, disponibilidad de grupos funcionales reactivos para reacciones directas con enzimas y para modificaciones químicas, hidrofiliicidad, estabilidad mecánica y rigidez, regenerabilidad y facilidad de preparación en diferentes configuraciones geométricas que proporcionen al sistema permeabilidad y un área superficial adecuada para una biotransformación específica. Es comprensible que, para aplicaciones en alimentos, farmacéutica, medicina y agricultura, también se requiera que los materiales sean no tóxicos y biocompatibles. Además, para responder a la creciente conciencia pública sobre la salud y el medio ambiente, los materiales deben ser biodegradables y, para resultar económicos, de bajo costo (Krajewska, 2004).

La quitina y el citosano son poliaminosacáridos naturales. La quitina es un componente principal de las conchas de los crustáceos, los exoesqueletos de los insectos y las paredes celulares de los hongos, donde proporciona resistencia y estabilidad. Químicamente, la quitina está compuesta por unidades de 2-acetamido-2-desoxi- β -d-glucosa (o N-acetil-D-glucosamina) unidas por enlaces β (1 $\rightarrow$ 4), formando un polímero lineal de cadena larga (ver Figura 15). Es insoluble en la mayoría de los disolventes. El citosano, (Krajewska, 2004) principal derivado de la quitina, se obtiene por N-desacetilación en grado variable que se caracteriza por el grado de desacetilación y, en consecuencia, es un copolímero de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. (Dutta et al., 2002) (ver Figura 15).

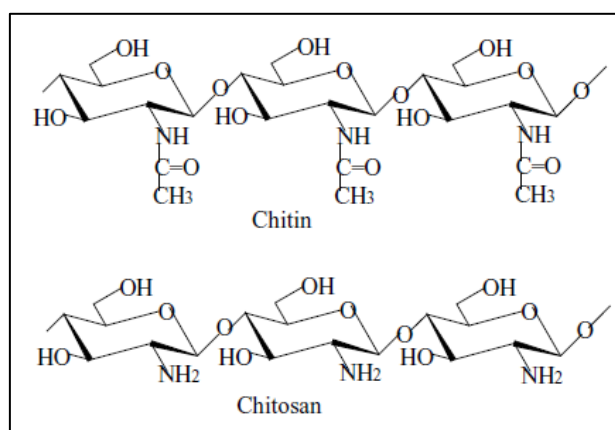


Figura 15. Estructura de la quitina y el citosano (Fuente: Krajewska, 2004).

El citosano es insoluble en agua, pero la presencia de grupos amino lo hace soluble en soluciones ácidas por debajo de un pH de aproximadamente 6,5. Es importante destacar que la quitina y el citosano no son entidades químicas únicas, sino que varían en composición dependiendo de su origen y del proceso de fabricación. El citosano puede definirse como quitina suficientemente desacetilada para formar sales de amina solubles, siendo necesario un grado de desacetilación del 80–85% o superior para obtener un producto soluble (Krajewska, 2004).

La quitina y el citosano se obtienen de manera económica a partir de las conchas de mariscos, como cangrejos y camarones, y los desechos de la industria pesquera. El proceso incluye la desacetilación de la quitina con NaOH para obtener citosano. Este proceso proporciona una solución eficiente y económica para la disposición de los desechos de conchas de crustáceos (Dutta et al., 2002; Tharanathan & Kittur, 2003).

El citosano tiene grupos amino e hidroxilo reactivos en sus cadenas lineales de poliglucosamina, susceptibles de modificaciones químicas (Dutta et al., 2002; Tharanathan & Kittur, 2003). Además, los grupos amino hacen del citosano un polielectrolito catiónico ($pK_a \approx 6,5$). Esta basicidad le da al citosano propiedades singulares: el citosano es soluble en medios ácidos acuosos a $pH < 6.5$ y cuando se disuelve posee una alta carga positiva en el grupo $-NH_3^+$. Esto le permite adherirse a superficies con carga negativa, agregarse con compuestos polianiónicos y quelar iones de metales pesados. Tanto la solubilidad en soluciones ácidas como la agregación con polianiones le otorgan al citosano excelentes propiedades de formación de geles. Así, junto con sus propiedades biológicas, que incluyen biocompatibilidad, biodegradabilidad en productos inocuos, no toxicidad, entre otros, la quitina y el citosano, ofrecen un potencial extraordinario para su uso en diversas áreas, como el tratamiento de aguas residuales, la industria alimentaria, la agricultura, la cosmética, la medicina y la biotecnología (Dutta et al., 2002; Kurita, 2001).

Como soportes para la inmovilización de enzimas, los materiales basados en quitina y citosano se utilizan en forma de polvos, hojuelas y geles con diferentes configuraciones geométricas. Por ejemplo, los polvos y hojuelas de quitina/citosano están disponibles como productos comerciales, entre otros, de Sigma-Aldrich.

Por su parte, la preparación de geles de citosano es promovida por el hecho de que el citosano se disuelve fácilmente en soluciones diluidas de la mayoría de los ácidos orgánicos, incluyendo fórmico, acético, tartárico y ácidos cítricos, para formar soluciones viscosas que precipitan al aumentar el pH y por la formación de complejos ionotrópicos insolubles en agua con polielectrolitos aniónicos. Los métodos de preparación de gel de citosano descritos en la literatura pueden dividirse ampliamente en cuatro grupos, entre los cuales destacan dos: método sol-gel y método de secado por atomización (en inglés: *spray drying*).

METODO SOL-GEL

El método sol-gel (método físico, Inclusión o atrapamiento en gel) se utiliza comúnmente para la obtención de matrices híbridas orgánico-inorgánicas, como membranas o películas porosas, adecuadas para la inmovilización de biomoléculas. En este enfoque, se parte de una solución de citosano disuelto en un ácido orgánico (como ácido acético), que se mezcla con un precursor, como TEOS (tetraetil ortosilicato) o APTES (3-aminopropiltietoxisilano). Las composiciones químicas de ambos precursores se muestran en las Figura 16 y Figura 17.

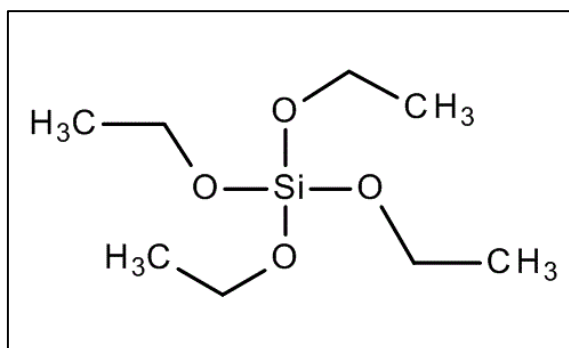


Figura 16. Formulación química del precursor TEOS.

Durante el proceso, el precursor sufre reacciones de hidrólisis y condensación, lo que da lugar a la formación de una red tridimensional de sílice. Esta red puede integrar al citosano y retener enzimas incorporadas previamente, generando un sistema híbrido sólido donde las biomoléculas quedan inmovilizadas físicamente (Krajewska, 2004).

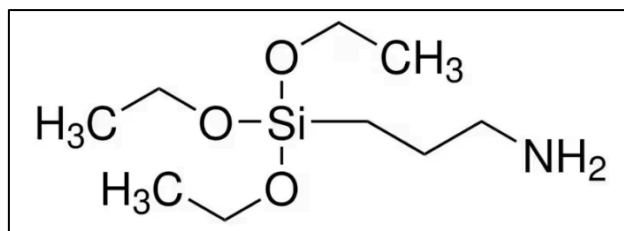


Figura 17. Formulación química del precursor APTES.

El material se vierte sobre una superficie y se deja secar a temperatura ambiente o controlada (por ejemplo, 60–70 °C). En algunos casos, se aplica una etapa de neutralización posterior (p. ej., con NaOH diluido) para estabilizar el quitosano y mejorar la resistencia estructural de la matriz en medios ácidos.

La inmovilización en este método se produce al atrapar físicamente las enzimas dentro de la red porosa formada, protegiendo su estructura y permitiendo su reutilización. Según las condiciones de síntesis, pueden obtenerse materiales con diferente grado de porosidad, desde películas densas hasta aerogeles, si se emplean métodos especiales de secado.

MÉTODO SPRAY DRYING

El spray drying (método físico, microencapsulación con una membrana sólida) es un método que permite la preparación de esferas más pequeñas en comparación con las obtenidas mediante otros métodos. Este enfoque utiliza un sistema de atomización para convertir una solución de quitosano, preparada previamente en un solvente adecuado, en pequeñas gotas mediante su pulverización en una corriente de aire caliente.

El proceso de secado por atomización es una operación unitaria que interviene en numerosas aplicaciones industriales. Para cada aplicación en concreto, el material granulado resultante debe poseer unas propiedades determinadas que dependen de las condiciones en las que se lleve a cabo el secado por atomización, y cuya dependencia debe conocerse para así optimizar la calidad del material obtenido (Mondragón et al., 2013). El concentrado se atomiza mediante un atomizador rotativo o boquillas de alta presión. El aire de secado entra a gran velocidad a través del dispersor de

aire para garantizar el mezclado óptimo con el concentrado atomizado. La evaporación es instantánea y tiene lugar cuando las pequeñas gotas pasan por la cámara de secado. El polvo procedente de la cámara de secado se recoge en un sistema de transporte y enfriamiento neumático. El aire de salida pasa por un filtro para separar las partículas restantes.



Figura 18. Spray dryer a escala laboratorio utilizado para la encapsulación de enzimas mediante el método de spray drying.

1.2.3.4.2. ENZIMAS ENCAPSULADAS EN HIDROGELES

Los hidrogeles son geles poliméricos hidrofílicos formados por una red tridimensional que tiene la capacidad de absorber una gran cantidad de agua sin disolverse en ella, hinchándose y aumentando considerablemente su volumen sin perder su forma, hasta alcanzar un máximo de hidratación o índice de hinchamiento. Esta propiedad, el índice de hinchamiento, es especialmente relevante ya que indica la cantidad de fluido que puede absorber el hidrogel en su interior (Mathur et al., 1996), es decir, la cantidad de sustrato que puede alojar.

Desde un punto de vista práctico, cuanto más sustrato penetre en el soporte donde se encuentra la enzima, mayor será la producción de producto por unidad de tiempo. Este comportamiento depende tanto de la composición inicial como de la densidad de entrecruzamiento del hidrogel. La capacidad de absorción de agua está relacionada, como se ha mencionado, con el carácter hidrofílico del propio

polímero, es decir, con la presencia de grupos funcionales hidrofílicos unidos al esqueleto polimérico (Cai & Gupta, 2002).

De hecho, la inmovilización en hidrogeles puede alterar la distribución del sustrato, los productos de reacción o los iones de hidrógeno entre el microambiente interno del hidrogel y el macroentorno que lo rodea, como consecuencia de interacciones electrostáticas o hidrofílicas/hidrofóbicas entre la matriz y los componentes del medio (González-Sáiz & Pizarro, 2001). Esto tiene efecto sobre la actividad y la cinética de la enzima, así como sobre su estabilidad.

En este contexto, se plantea el uso de hidrogeles de poliacrilamida como soporte para la inmovilización enzimática, debido a su elevada biocompatibilidad, estabilidad química y facilidad para formar redes tridimensionales estables y bien definidas (De Souza, 2014). Para ello, se empleará la técnica de polimerización en masa, que permite obtener soportes robustos y homogéneos, adecuados para ensayos de liberación controlada y reutilización en condiciones ambientales simuladas.

MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN EN MASA

El método de polimerización en masa (método físico, Inclusión o atrapamiento en gel) es un método convencional que implica la polimerización de una solución. La reacción se lleva a cabo con un monómero y un iniciador como componentes principales, sin el uso de disolventes ni dispersantes, lo que lo convierte en el método más simple en cuanto a formulación. La polimerización adopta la forma fija del recipiente de reacción en el momento en que se produce la solidificación.

Este tipo de polimerización resulta ventajoso para la producción de productos moldeados “en fundido”, como es el caso de los centelleadores de poliestireno (Bhat & Kandagor, 2014). No obstante, el principal desafío de la polimerización en masa radica en la disipación del calor generado durante el proceso, ya que la naturaleza exotérmica de la reacción puede provocar un sobrecalentamiento de la muestra.

Por otro lado, el polímero resultante suele presentar una distribución de masas moleculares no uniforme, lo que puede afectar a la homogeneidad y consistencia de la red que se forma y que sirve como soporte para las enzimas. Sin embargo, esta distribución puede modificarse fácilmente mediante el uso de un tensioactivo (Roy et al., 2023).

1.2.4. LEGISLACIÓN EUROPEA

1.2.4.1. P COMO UN RECURSO A SER RECUPERADO DE LAS AGUAS RESIDUALES

La Tabla 3 muestra el marco regulatorio para la recuperación de P en la Unión Europea. Una regulación incipiente sobre la recuperación de P de aguas residuales surgió principalmente en la Unión Europea (UE), donde existen leyes sobre esta actividad tanto a nivel comunitario como nacional (Sichler et al., 2022).

La legislación de la UE exige el tratamiento de fangos antes de su uso agrícola y prohíbe la aplicación de fangos no tratados en tierras agrícolas, salvo que sean inyectados o incorporados al suelo. Como parte del progreso hacia un nuevo desarrollo sostenible, el “Pacto Verde Europeo” incluye un “Plan de Acción para una Economía Circular” que se centra en la reutilización del agua en la agricultura y la gestión integrada de nutrientes. Además, la Directiva Marco de Residuos (2008/98/EC) introduce principios de gestión de residuos, como el “principio de quien contamina paga” y el “esquema de responsabilidad ampliada del productor” (European Parliament and Council, 2008).

En el paradigma de la economía circular, el P puede recuperarse de las aguas residuales como un producto valioso (por ejemplo, sal de fosfato precipitada (MgP, CaP o FeP), así como de los fangos y/o deyecciones ricas en P, convirtiéndolos en materiales ricos en P mediante diferentes procesos, incluyendo pirólisis, gasificación, compostaje, digestión anaerobia y otros tratamientos biológicos o termoquímicos (por ejemplo, biochar). La estruvita es el producto más frecuentemente recuperado, representando el 74% del mercado. Las tecnologías más empleadas para su obtención son Pearl® (OSTARA) con un 18 % de participación, seguida de AirPrex® (10 %) y NuReSys® (13 %) (Egle et al., 2015; Kabbe, 2017; Muys et al., 2021; Shaddel et al., 2019). Sin embargo, para ser utilizados como fertilizantes, los productos de P recuperado deben cumplir con los criterios de calidad

agrícola, ambiental y de salud de acuerdo con la legislación sobre fertilizantes (Morgenschweis, 2015).

Tabla 3. Marco regulatorio de la recuperación de P de las aguas residuales en la Unión Europea (Adaptado de Carillo et al., 2024).

Norma	Institución responsable	Plazos de implementación	Aspectos destacados del contenido
Directiva 86/278/CEE sobre la protección del medio ambiente y del suelo cuando se utiliza lodo de depuradora en la agricultura	Comisión Europea (CE)	–	Exige que el lodo se utilice de forma que se consideren las necesidades nutricionales de las plantas y que no deteriore la calidad del suelo, aguas superficiales o subterráneas.
Directiva marco de residuos (2008/98/CE)	Parlamento Europeo y Consejo (EPC)	2020	Gestión de residuos en la UE, incluyendo prevención, reutilización, reciclaje y valorización.
Cierre del ciclo - Plan de acción para la economía circular	Comisión Europea (CE)	-	Es un conjunto de medidas o estrategias, generalmente impulsada por organismos oficiales que promueve la sostenibilidad y la eficiencia en el uso de recursos, ofreciendo orientación y apoyo para fomentar su implementación en toda Europa.

1.2.4.2. P COMO UN PRODUCTO RECUPERADO

La Tabla 4 presenta algunas regulaciones que rigen los productos de P recuperado, los requisitos de calidad y su aplicación en la agricultura. La legislación europea actual es la más avanzada entre todas las naciones; sin embargo, está bastante fragmentada. Las EDAR que promueven la recuperación de residuos, la valorización o el reciclaje están sujetas a la Directiva de Impacto Ambiental (2011/92/EU), la Directiva de Emisiones Industriales (2010/75/EU) y la Directiva Marco de Residuos (2008/98/EC) (European Parliament and Council, 2010, 2011; European Parliament and Council, 2008; Hukari et al., 2016). Es importante tener en cuenta que la aplicación de una directiva específica para proyectos de

recuperación de P puede variar según las leyes y regulaciones específicas de cada país miembro de la UE.

Todas las empresas deben obtener permisos para sus instalaciones de recuperación de P. Actualmente, la mayoría de las EDAR están clasificadas como instalaciones de “gestión de residuos” y deben seguir reglas más estrictas y costosas que las empresas de fertilizantes químicos. Como resultado, las EDAR a menudo etiquetan su P recuperado como "residuo" en lugar de fertilizante dentro del marco de la economía circular, lo que genera complicaciones legislativas (Jupp et al., 2021). Además, la Directiva Marco de Residuos define conceptos clave como la valorización y eliminación de residuos y cuándo deja de ser un residuo, términos esenciales para la gestión del P, diferenciando los residuos de P, los subproductos y las materias primas secundarias (Kabbe, 2017). Si la EDAR produce un fertilizante (producto), debe ser identificada como "productora de fertilizantes", lo que requiere verificación y la información relevante sobre los procesos de tratamiento (European Parliament and Council, 2019; Hukari et al., 2016).

Además, el nuevo Reglamento UE 2019/1009 sobre productos fertilizantes establece normas y requisitos para la comercialización de fertilizantes y su uso. Algunos aspectos clave son la introducción de la clasificación y el etiquetado de los productos fertilizantes. Esto implica la definición de categorías de función del producto (PFC) y categorías de materiales componentes (CMC) que abarcan tanto los materiales utilizados como fertilizantes como las materias primas para su producción (European Parliament and Council, 2019; Garske et al., 2020). El reglamento también incorpora nuevos conceptos de CMC como digestatos, subproductos de origen animal, estruvita, biochar, fangos de depuradora y sus cenizas derivadas, facilitando el libre comercio de CMC en Europa. Otro cambio importante es que introduce límites para contaminantes tóxicos como el cadmio (Cd), ya que los fertilizantes de P vírgenes suelen contener concentraciones de Cd significativamente más altas que los materiales recuperados (Jupp et al., 2021).

Tabla 4. Regulaciones que rigen los productos de P recuperado, los requisitos de calidad y su aplicación en la agricultura en la Unión Europea (Adaptado de Carillo et al., 2024).

Normativa	Institución	Aplica a / Regula	Aspectos destacados del contenido	Criterios de calidad
Directiva sobre lodos de depuradora – 86/278/CEE	Comisión Europea	Aplicación agrícola de lodos de depuradora	Prohíbe el uso de lodo sin tratar en tierras de cultivo; regula contaminantes; establece estándares comunitarios restrictivos para la protección del suelo y la salud humana.	Materia seca y orgánica, pH, nitrógeno y fósforo, cadmio, cobre, níquel, plomo, zinc, mercurio, cromo
Reglamento de fertilizantes 2003/2003/CE, modificado por el Reglamento UE 2019/1009	Comisión Europea	Fertilizantes — compuestos químicos que proporcionan nutrientes	Introduce límites para contaminantes tóxicos y siete categorías de productos fertilizantes, como fertilizantes orgánicos y organominerales, enmiendas del suelo, inhibidores, bioestimulantes y sustratos. Lista ampliada con fosfatos precipitados (estruvita) en julio de 2022.	Micronutrientes (boro, cobalto, hierro, manganeso, molibdeno) y macronutrientes (nitrógeno, fósforo), pH, conductividad, metales pesados (cadmio, cromo, plomo, mercurio, níquel, arsénico), microorganismos y carbono orgánico
Directiva marco de residuos 2008/98/CE	Comisión Europea	Valorización de residuos	Explica cuándo un residuo deja de serlo y se convierte en materia prima secundaria; distingue entre residuos y subproductos; clasifica la producción en	N/A

Normativa	Institución	Aplica a / Regula	Aspectos destacados del contenido	Criterios de calidad
			EDAR como operación de “gestión de residuos”.	
Directiva de evaluación de impacto ambiental 2011/92/UE	Comisión Europea	Fabricantes de fertilizantes / plantas de tratamiento de aguas	Si el residuo se usa como materia prima para producir fertilizante, se requiere una EIA para instalaciones de eliminación de residuos que incineren, traten químicamente o depositen residuos peligrosos en vertederos.	N/A
Directiva sobre emisiones industriales, Directiva 2010/75/UE	Comisión Europea	Instalaciones de fabricación de fertilizantes	Otorga permisos para actividades de recuperación de residuos y operaciones de eliminación; establece límites de emisiones y residuos vinculados a la producción de fertilizantes.	Límites de emisiones y residuos relacionados con la producción de fertilizantes

N/A: no aplica

Otro desafío para cerrar el ciclo del P es la necesidad de establecer una cadena de valor circular, en la que la recuperación actúe como oferta y el reciclaje como demanda (Jupp et al., 2021). Actualmente, el mercado de fosfatos presenta características oligopólicas con tendencias monopolísticas, debido al número limitado de países proveedores (De Boer et al., 2018). Además, el bajo coste del P primario es un factor económico relevante a la hora de desarrollar una cadena de valor competitiva para productos de P recuperado, como la estruvita (Shaddel et al., 2019).

La entrada del P recuperado al mercado se enmarca en el Plan de Acción para la Economía Circular, el Reglamento UE 2019/1009 sobre productos fertilizantes, y la Directiva Marco de Residuos 2008/98/CE. Esta última establece los criterios de fin de la condición de residuo que un material debe cumplir para dejar de considerarse residuo y poder comercializarse como producto. Dichos criterios dependen del segmento de mercado (fertilizante, enmienda, suplemento alimenticio, etc.) y están sujetos a normativas específicas.

En el caso particular de la estruvita, su inclusión como fertilizante marcado CE (producto fertilizante que cumple con los requisitos establecidos en el Reglamento UE 2019/1009) fue formalizada mediante el Reglamento Delegado UE 2021/2086, que modifica el anexo II del Reglamento UE 2019/1009 para añadir los fosfatos precipitados, incluyendo estruvita y brushita, como materiales componentes de productos fertilizantes.

La transición de un material desde la categoría de “residuo” a la de “producto” exige, además, el cumplimiento de requisitos normativos adicionales, como los establecidos en el Reglamento CE n.º 1907/2006 (REACH), relativo al registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas, y el Reglamento CE n.º 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (Hukari et al., 2016).

En Europa, la aprobación bajo el marco legislativo REACH y las regulaciones de fertilizantes es necesaria para su comercialización sin restricciones. La aceptación de fertilizantes con certificación CE varía entre un 5% en Dinamarca y Suecia y un 80-100% en Alemania y España, y en promedio representan aproximadamente entre el 60-70% del volumen total del mercado. Sin embargo, uno de los principales desafíos de reutilizar subproductos que contienen P es que las empresas de fertilizantes no pueden aceptar productos de P recuperado a menos que proporcionen algún beneficio económico para su negocio (Hukari et al., 2016). Por ejemplo, el costo de la recuperación de P varía según las diferentes tecnologías, entre 2 y 28 €/kg de P recuperado, siendo la recuperación de P de la fase acuosa la más económica (2–10 €/kg de P recuperado), mientras que el precio del fosfato de roca varía entre 0,5 y 1,2 €/kg de P, y el precio del fertilizante de superfosfato triple entre 1,2 y 2,2 €/kg de P. Por lo tanto, la falta de incentivos económicos y el bajo precio de mercado de los

productos de P hacen que el reciclaje sea poco atractivo, desalentando la práctica de recuperar y reciclar P en el sector de tratamiento de aguas residuales (Egle et al., 2016).

1.2.4.3. APLICACIÓN DEL P RECUPERADO EN EL SUELO EN AGRICULTURA

La Directiva sobre fangos de depuradora (86/278/EEC) regula el uso y la aplicación controlada de fangos de depuradora, una práctica habitual en la agricultura debido a su alto contenido en nutrientes, aunque no exenta de controversia por la presencia de microcontaminantes potencialmente perjudiciales para la salud humana y ambiental (ver Tabla 4). Si bien esta directiva no se centra específicamente en la recuperación de P, sí aborda aspectos clave relacionados con la gestión, composición y aplicación de fangos, los cuales pueden contener P recuperable.

El texto europeo ha sido transpuesto y desarrollado en España a través de normativas específicas, como:

- El Real Decreto 1310/1990, que regula el uso de los lodos de depuración en el sector agrario, y que fue modificado por el Real Decreto 1051/2022 para adaptarse a las nuevas exigencias medioambientales y de trazabilidad.
- El reciente Real Decreto 840/2024, que modifica al RD 1051/2022 y establece criterios más estrictos en el marco de la nutrición sostenible de los suelos agrarios, reforzando el control sobre contaminantes y la valorización de residuos como los biosólidos.

Estas normativas establecen restricciones concretas como:

- Prohibiciones de uso en determinados cultivos (por ejemplo, frutas y hortalizas que estén en contacto directo con el suelo).
- Restricciones temporales (prohibición de aplicación poco antes de la cosecha).
- Prohibición en zonas de pastoreo animal.

A nivel europeo, algunos países han ido más allá. En Alemania, Bélgica, Países Bajos y Suiza, se ha prohibido el uso directo de biosólidos en tierras agrícolas, principalmente por razones de seguridad alimentaria, optando en su lugar por tecnologías de tratamiento avanzado o valorización energética.

Los gobiernos locales y las autoridades agrícolas han implementado regulaciones que limitan la fertilización con P procedente principalmente de fuentes convencionales, como fertilizantes minerales y residuos orgánicos, en tierras cultivables (Sarvajayakesavalu et al., 2018). Esto requiere un cambio en las prácticas agrícolas hacia la adopción de fuentes alternativas de nutrientes (Barquet et al., 2020). Las regulaciones relacionadas con la aplicación de P en la agricultura son actualmente limitadas y varían según el país o la región. Por ejemplo, la Directiva 86/278/EEC requiere que el uso de fangos de depuradora tenga en cuenta las necesidades de nutrientes de las plantas y evite el deterioro de la calidad del suelo y del agua. Alemania promueve buenas prácticas para optimizar la interacción entre el P y las plantas, mejorando el rendimiento y la calidad de los cultivos y preservando la fertilidad del suelo (Garske et al., 2020). En Estados Unidos, la Ley de Mejora de la Calidad del Agua de Maryland regula la aplicación de biosólidos con P en la tierra de la misma manera que los fertilizantes y el estiércol (Lu et al., 2012). En China, el enfoque ha estado en las prácticas agrícolas sostenibles, y en 2016 se implementó el Plan de Acción para la Prevención y Control de la Contaminación del Suelo, que incluye la gestión adecuada de los fangos de depuradora en la agricultura (Sun et al., 2016).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis es maximizar la extracción de P en etapas previas a la digestión anaerobia, poniendo el foco en la extracción de la parte orgánica del P mediante hidrólisis enzimática. La finalidad es liberar la mayor cantidad posible de P y evitar su precipitación no controlada en el digestor. Las corrientes líquidas resultantes, enriquecidas en P, podrán ser aprovechadas posteriormente mediante tecnologías de recuperación, como la cristalización en forma de estruvita, fuera del alcance de esta tesis.

Para cumplir con este objetivo, se perseguirán los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar a escala laboratorio la extracción del P orgánico mediante enzimas hidrolíticas comerciales.
 - Desarrollar un procedimiento de encapsulación de la enzima a escala laboratorio y estudiar el rendimiento de extracción del P orgánico con la enzima encapsulada.
 - Simular distintos escenarios de operación de la EDAR que permitan maximizar el potencial de recuperación del P en etapas previas al proceso de digestión anaerobia, disminuyendo así su precipitación en esta unidad.
 - Analizar mediante simulación el efecto de la adición de enzimas bajo los diferentes esquemas de operación planteados evaluando el potencial de extracción de P en la EDAR, así como el rendimiento global de la misma.
 - Estudiar la viabilidad tecno-económica de la recuperación de P bajo los diferentes esquemas de operación simulados.
-

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA EDAR DE CALAHORRA

En la Figura 19 se presenta el diagrama de flujo de la EDAR de Calahorra, de la que proceden los sustratos (fango secundario y fango mezcla) utilizados en los ensayos enzimáticos incluidos en esta tesis doctoral. En el diagrama se representan las líneas de agua y fango de la EDAR de la Calahorra, la cual tiene una capacidad de tratamiento de agua residual de $23.000 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$.

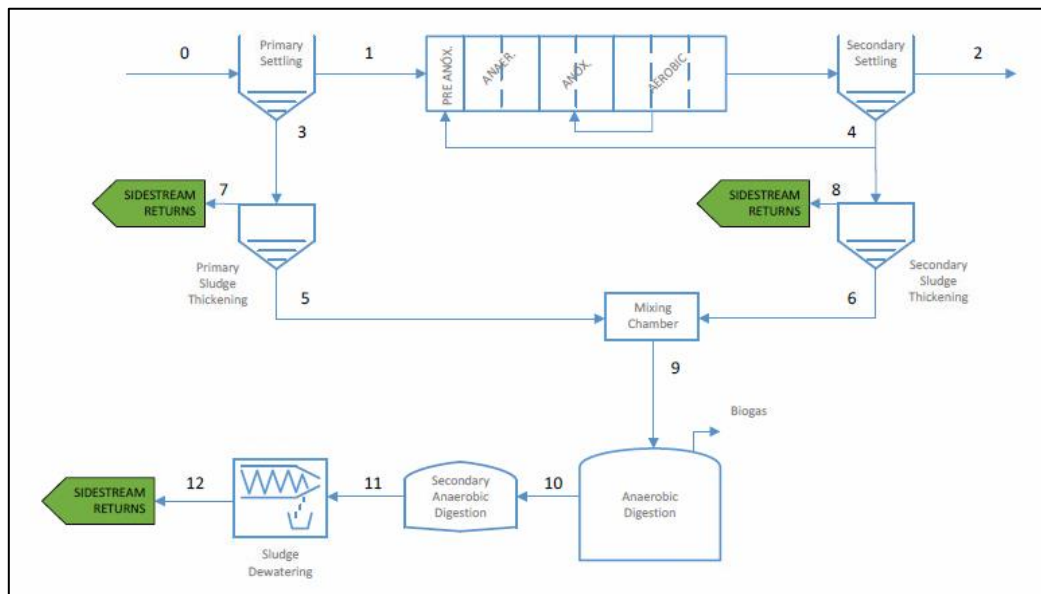


Figura 19. Diagrama de flujo de la EDAR de Calahorra.

La línea de agua de esta EDAR está compuesta de los siguientes tratamientos:

1. **Tratamiento primario:** tras el correspondiente pretratamiento, el agua pasa a los decantadores primarios, donde se retiene, en forma de fango primario, una buena parte de la materia en suspensión en el agua. Esa materia, depositada en el fondo de los decantadores, se extrae mediante bombas y se incorpora a la línea de fangos como fango primario.
2. **Tratamiento secundario:** tras el decantador primario, el agua pasa al tratamiento secundario, conformado por el reactor biológico, que está diseñado para la eliminación biológica de N y P (configuración A2O). El volumen total del reactor es de 15.255 m^3 dividido en zonas

anaerobias, anóxicas y aerobias. Desde el reactor el agua pasa a los decantadores secundarios, donde se separa el agua de la materia en suspensión. Una parte de la materia en suspensión retenida en el decantador se recircula al reactor para mantener una concentración elevada de microorganismos y asegurar así la continuidad del proceso. El resto se extrae del sistema, incorporándolo a la línea de fangos como fango secundario.

Por otra parte, la línea de fangos se compone de los siguientes elementos:

1. **Espesador de fango primario:** los fangos primarios, después de haber sido tamizados (para retirar partículas gruesas), se envían a un espesador de gravedad, donde se concentran para reducir su volumen.
 2. **Espesador de fango secundario:** el fango secundario, que se extrae en la purga del decantador secundario, pasa a una centrífuga para su espesado. Este **fango secundario** decantado constituye uno de los dos tipos de fangos utilizados como sustratos en los ensayos experimentales.
 3. **Cámara de mezcla:** tanto los fangos primarios como los secundarios, una vez espesados, son bombeados a una cámara de mezcla de 65 m^3 de volumen, en la cual el tiempo de retención hidráulico se sitúa en torno a 16-22 h. Esta cámara está equipada con un agitador que impide sedimentaciones. Una vez mezclados, cuando alcanzan una concentración media en torno a $40 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, se bombean al proceso de digestión anaerobia de fangos. De esta cámara de mezcla se extrae el segundo tipo de sustrato utilizado como sustrato en los ensayos enzimáticos.
 4. **Digestión anaerobia:** los dos tipos de fango, una vez espesados y mezclados, se estabilizan en dos digestores anaerobios, cada uno de 1.930 m^3 de volumen unitario. El contenido de los digestores se agita para favorecer la mezcla y se mantiene a una temperatura próxima a los 35°C , que se consigue aprovechando el calor recuperado en el circuito de refrigeración del motor generador existente en la EDAR, que valoriza energéticamente el biogás producido en los digestores.
-

5. **Depósito tampón:** Los fangos digeridos se almacenan en un depósito tampón de 494 m³, como paso intermedio al proceso de deshidratación al que es necesario someterlos para conseguir una concentración y una consistencia que faciliten su manipulación.
6. **Deshidratador de fango digerido:** para deshidratar el fango, la planta dispone de dos centrifugas de 15 m³·h⁻¹ de caudal unitario que permiten obtener un fango con una sequedad mínima del 25%. Para facilitar la deshidratación se acondiciona previamente el fango añadiendo polielectrolito. Con ese fin la instalación dispone de un equipo con capacidad para preparar 1.500 L·h⁻¹ de reactivo. El fango deshidratado se almacena en un silo de 60 m³ de capacidad al que llega impulsado desde la salida de las centrifugas mediante dos bombas de tornillo. Desde el silo se cargan los vehículos para conducir el fango a la planta de compostaje aneja a la EDAR o bien directamente a las parcelas en las que se aplicará como enmienda orgánica para la agricultura.

3.2. SUSTRATOS

Para el estudio del efecto de la adición de enzimas hidrolíticas para potenciar la liberación de P se barajaron inicialmente tres sustratos diferentes: fango primario, fango secundario y fango mezcla (compuesto por una combinación de los dos anteriores).

El fango primario contiene importantes cantidades de P orgánico asociado fundamentalmente al elevado contenido de materia orgánica particulada presente en el agua residual afluente a la EDAR. Si bien parte de este P orgánico puede ser más fácilmente hidrolizable que el asociado a la biomasa presente en el fango secundario (B. Yu et al., 2021; Zhang, 2019), la aplicación de enzimas sobre el fango primario también podría favorecer la degradación de compuestos orgánicos más lentamente biodegradables y, por tanto, del P asociado a estos compuestos. Así mismo, el fango primario se caracteriza por presentar una elevada proporción de bacterias acidogénicas hidrolíticas que podrían producir sinergias con las enzimas adicionadas.

El fango secundario contiene un elevado porcentaje de microorganismos con importantes cantidades de P asociado a la estructura celular de los mismos (31-62% de P asociado a la biomasa,

Petriglieri et al., 2022). Este P asociado a la biomasa es un P orgánico que requiere de procesos de hidrólisis relativamente lentos para su liberación al medio. De hecho, gran parte de este P es liberado durante la digestión anaerobia del fango, donde se emplean elevados tiempos de residencia (del orden de 20 días). Por tanto, la adición de enzimas sobre el fango secundario podría acelerar los procesos de hidrólisis de este P orgánico permitiendo su liberación antes de la digestión, favoreciendo así su recuperación. Así mismo, el fango secundario de la EDAR de Calahorra contiene una población activa de bacterias PAO, fundamentales en la liberación biológica de P intracelular asociado a las reservas de polifosfato, lo que generaría un efecto sinérgico que puede potenciar la eficiencia global del sistema.

Por último, el fango mezcla, como su nombre indica, está constituido por la mezcla del fango primario y secundario una vez espesados. A priori, este sustrato sería el ideal dado que contiene todo el P orgánico susceptible de ser hidrolizado. Así mismo, la mezcla de estos fangos se realiza en un tanque (cámara de mezcla), lo que permitiría la adición y homogenización de las enzimas con el fango sin necesidad de instalar un tanque específico como ocurriría si se realizara la adición de enzimas sobre el fango primario o secundario de forma separada, lo cual implicaría un aumento significativo en la complejidad del sistema y en los costes asociados. Por otro lado, el fango mezcla ofrecería un doble mecanismo de liberación de P: i) las bacterias PAO presentes en el fango secundario liberarían $P-PO_4$ al medio al consumir los AGV que aporta el fango primario; y ii) la propia acción de las enzimas hidrolíticas añadidas. Además, las condiciones térmicas de operación en la EDAR de Calahorra favorecen aún más el uso del fango mezcla. Las enzimas hidrolíticas utilizadas presentan una temperatura óptima de actuación de entre 50°C y 55°C (ver Tabla 5 y Tabla 6). Aunque esta temperatura no se alcanza en la EDAR, el fango mezcla se calienta previamente hasta los 35°C antes de entrar al digestor anaerobio, lo que lo situaría a la mezcla de fango y enzima mucho más cerca del intervalo óptimo para la acción enzimática.

En base a todo lo anterior se seleccionaron, como sustratos para los ensayos enzimáticos, el fango secundario sin espesar y el fango mezcla.

3.3. ENZIMAS HIDROLÍTICAS

3.3.1. ENZIMAS FITASAS

La mezcla de enzima comercial tipo fitasa usada en el proyecto fue adquirida a la casa comercial ASA Spezialenzyme GmbH (Alemania). Las condiciones para un uso óptimo de las enzimas fueron suministradas por el proveedor del cóctel enzimático y se presentan en la Tabla 5. Las enzimas llegaron en estado líquido, y se dosificaron en mililitros (mL) por kilogramo de sustrato en base húmeda (b.h.) utilizado. La densidad de este cóctel enzimático es de $1.190 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. La ficha técnica proporcionada por la casa comercial se muestra en el apartado 7.4.1 de Anejos.

Tabla 5. Condiciones operacionales óptimas de la enzima fitasa (casa comercial ASA Spezialenzyme GmbH).

Dosis óptima (g enzima·kg ⁻¹ fango b.h.)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Intervalo pH óptimo
100	50	20	5,5 – 6,6

3.3.2. ENZIMAS CELULOLÍTICAS

En los ensayos realizados con este tipo de enzimas se ha empleado el complejo multi-enzimático celulolítico Viscozyme® L, proporcionado por la casa comercial Sigma-Aldrich (Alemania). Las condiciones óptimas de trabajo de esta enzima dadas por el fabricante son las que se detallan en la Tabla 6. La densidad de este cóctel enzimático es de $1.200 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. La ficha técnica proporcionada por la casa comercial se muestra en el apartado 7.4.2 de Anejos.

Tabla 6. Condiciones operacionales óptimas de la enzima celulolítica (casa comercial Sigma-Aldrich – Merck).

Dosis óptima (g enzima·kg ⁻¹ fango b.h.)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Intervalo pH óptimo
15	55	25	3,5 – 5,5

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO

El ácido fítico es un compuesto de origen natural cuya cuantificación en matrices biológicas y ambientales constituye un reto analítico considerable (Bradshaw, 2019). Aunque su determinación ha sido ampliamente desarrollada en el ámbito agroalimentario y nutricional, especialmente en productos vegetales (Nielsen et al., 2013; Tur et al., 2013), no se dispone de metodologías estandarizadas para su análisis en matrices complejas como el fango de EDAR. Solo se han desarrollado **unos pocos ensayos para medir los niveles de ácido fítico en muestras biológicas complejas**, como muestras de orina, heces o plasma (animal o humano) (Bradshaw, 2019; Joung et al., 2007; Tur et al., 2013). Esta limitación se debe, en gran parte, a la alta interferencia de sólidos en suspensión, materia orgánica y compuestos minerales, que dificultan tanto la extracción eficaz del compuesto como su detección precisa (Ran et al., 2025).

En función de lo comentado anteriormente, en la presente tesis se decidió evaluar el contenido en ácido fítico en el sustrato fango mezcla, mediante dos determinaciones diferentes:

1. Un **método colorimétrico** basado en la formación de un complejo férrico, descrito originalmente por Haug & Lantzsch, 1983 para la medición de ácido fítico en cereales, adaptado para realizar la cuantificación de ácido fítico en fango de EDAR.
2. Una **técnica instrumental de alta sensibilidad** mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), desarrollada para matrices biológicas como plasma (Tur et al., 2013), y aquí aplicada por primera vez a fangos de EDAR.

Para este análisis se seleccionó el fango mezcla como matriz principal de estudio, en lugar del fango secundario, debido a su mayor heterogeneidad composicional y a la probable presencia más elevada de ácido fítico.

3.4.1. MÉTODO COLORIMÉTRICO

La determinación del ácido fítico se realizó siguiendo el método colorimétrico descrito por Haug & Lantzsch, 1983, con ligeras modificaciones para su aplicación en muestras específicas. Este método permite una determinación rápida contenido de ácido fítico en muestras de origen vegetal. El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre el Fe (III) y el ácido fítico presente en la muestra, y en la posterior cuantificación del hierro remanente en solución mediante su reacción con 2,2'-bipiridina.

Para la extracción del ácido fítico, se pesaron 0,12 g de muestra (por duplicado) y se extrajeron con 20 mL de HCl 0,2 N bajo agitación mecánica durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 minutos.

Para el análisis, se mezclaron 0,5 mL del extracto con 1,0 mL de una solución férrica (0,2 g de sulfato férrico de amonio·12H₂O disueltos en 100 mL de HCl 0,2 N, y aforados hasta 1 000 mL con agua destilada). La mezcla se colocó en tubos tapados con una canica (para evitar ebullición brusca) y se incubó en un baño de agua en ebullición durante 30 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 2,0 mL de la solución de 2,2'-bipiridina (preparada con 10 g de 2,2'-bipiridina y 10 mL de ácido tioglicólico aforados hasta 1 000 mL con agua destilada), se mezcló y se midió la absorbancia a 519 nm exactamente 30 segundos después de la adición del reactivo.

La concentración de ácido fítico se determinó haciendo uso de una curva de calibración elaborada con soluciones patrón preparadas a partir de sal sódica de ácido fítico (con un contenido del 22 % de P como fitato). La curva incluyó nueve concentraciones diferentes, abarcando un rango de 5 a 49 µg P_{fítico}·mL⁻¹, con sus correspondientes medidas de absorbancia.

3.4.2. MÉTODO POR HPLC

La cuantificación de ácido fítico se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), tomando como referencia la metodología descrita por Tur et al., 2013, aunque con adaptaciones específicas desarrolladas y aplicadas en el marco de este trabajo.

Para la extracción del ácido fítico, se pesaron 0,12 g de muestra y se sometieron a digestión ácida con 20 mL de HCl 0,2 N durante 30 minutos a 100°C. La solución resultante fue centrifugada para separar el sobrenadante, que se utilizó en la preparación de las muestras para el análisis cromatográfico.

La preparación del extracto consistió en la adición de 20 µL de una solución de EDTA 0,1 M y 20 µL de ácido tricloroacético 6,1 N a 200 µL del sobrenadante obtenido tras la digestión. Las mezclas fueron agitadas en un vórtex y centrifugadas a 5 200 × g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperaron 60 µL del sobrenadante, que fueron diluidos con 60 µL de tampón TEAA (en inglés: *triethylammonium acetate*, acetato de trietilamonio) 50 mM (pH 9). Después de una segunda centrifugación, se inyectaron entre 20 y 50 µL de muestra en el sistema HPLC-MS.

El análisis se llevó a cabo en modo de ionización por electrospray negativo (ESI^-), utilizando monitoreo de ion seleccionado (SIM) para la detección del ácido fítico, con un ion característico en m/z 659. La separación cromatográfica se realizó mediante una columna LiChrospher 100 RP-18 (5 µm), empleando una fase móvil en gradiente compuesta por acetonitrilo (fase A) y tampón TEAA 50 mM pH 9 (fase B), a un caudal de 0,8 mL·min⁻¹, temperatura de columna de 40°C y un tiempo total de análisis de 7 minutos.

La curva de calibración se elaboró con soluciones patrón de ácido fítico en un rango de concentraciones entre 500 y 50 000 ng·mL⁻¹, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 500 ng·mL⁻¹.

3.5. ENSAYO DE REFERENCIA CON SUSTRATO PATRÓN DE ÁCIDO FÍTICO

Con el objetivo de validar la funcionalidad de la fitasa en su forma libre, antes de su aplicación en matrices complejas, se realizó un ensayo de referencia utilizando una solución patrón de ácido fítico. Este ensayo preliminar sirvió para confirmar que la enzima era capaz de hidrolizar el fitato y liberar $P-PO_4$ en condiciones controladas, lo que proporciona una primera aproximación a su comportamiento bajo condiciones ambientales.

Se prepararon dos reactores de 250 mL:

- Un **reactor control (R0_patrón)**, sin adición de enzima.
- Un **reactor experimental (R25_patrón)**, al que se añadió enzima fitasa libre a una dosis equivalente al **25 % de la dosis óptima recomendada por el fabricante** (25 g de enzima/kg de fango).

Ambos reactores contenían una mezcla de 125 mL de una solución preparada a partir de fitato de sodio (Sodium phytate, Sigma-Aldrich, ref. P8810, pureza $\geq 90\%$), utilizado como fuente de P orgánico, y 125 mL de agua. Estos fueron introducidos en una cámara orbital modelo Stuart Shaking incubator SI500, fijándose una temperatura de 35°C , elegida como valor intermedio entre la temperatura ambiente y el rango óptimo de actividad de la enzima ($50\text{--}55^\circ\text{C}$), con el objetivo de reproducir un entorno más representativo de un sistema ambiental.

La incubación se realizó durante 72 horas, con agitación constante. Este periodo se seleccionó con el objetivo de evaluar la estabilidad de la solución patrón a lo largo del tiempo en condiciones controladas, y también (aunque en menor medida) para permitir que la enzima tuviera un tiempo adecuado de actuación sobre el sustrato. Al finalizar, se cuantificó la concentración de $P-PO_4$ en las muestras mediante análisis colorimétrico, permitiendo calcular la liberación neta de P y la eficacia relativa del tratamiento enzimático.

Para la preparación del patrón de ácido fítico, se disolvieron 0,15 g de sal sódica del ácido fítico (contenido en P como fitato entre el 19 % y el 25 %) en 100 mL de agua destilada, obteniéndose una

solución estándar estable, ya que no contiene fitasa que pudiera degradar el compuesto. La concentración resultante de la solución patrón fue de 1,5 mg de sal sódica del ácido fítico por mL, lo que equivale a 330 µg de P_{phytase} /mL, considerando el 22 % de P en la sal utilizada.

3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FITASA

La actividad de las enzimas fitasa comerciales se determinó mediante un método colorimétrico basado en la cuantificación del P-PO₄ liberado tras la hidrólisis del ácido fítico, según el protocolo descrito por (Kim et al., 1998). La reacción enzimática se realizó incubando una mezcla compuesta un patrón de ácido fítico (fitato de sodio, el mismo reactivo utilizado en el ensayo de referencia descrito en el apartado 3.5), en concentraciones de 1,6–2 mM, buffer específico (acetato sódico pH 5.5 para fúngicas) y 1 mM de CaCl₂, junto con una alícuota de la muestra enzimática. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos.

La reacción se detuvo añadiendo ácido tricloroacético (TCA al 15 %) y, posteriormente, se adicionó el reactivo colorimétrico compuesto por ácido sulfúrico, molibdato de amonio y ácido ascórbico. El complejo fosfomolibdato reducido se cuantificó espectrofotométricamente a 820 nm.

Se incluyeron dos blancos por cada ensayo:

- Blanco de sustrato (sin enzima): contenía fitato de sodio (sustrato), pero no se añadió muestra enzimática. Se utilizó para descartar liberación espontánea de P-PO₄.
- Blanco de muestra (sin sustrato): contenía la muestra enzimática, pero no se añadió fitato de sodio (sustrato). Se empleó para corregir la presencia basal de P en la muestra.

La concentración de P liberado se determinó mediante interpolación en una curva de calibración construida con estándares de fosfato monobásico de potasio. La unidad de actividad enzimática (U/mL) se definió como los µmol de P liberado por minuto y por mililitro de muestra, calculándose como se indica a continuación:

$$\frac{U}{mL} = \frac{P_L * 20 * FD}{31 * t} \text{ (Ec. 3)}$$

Donde los P_L son los μg de P liberado del fitato por la acción de la fitasa de la muestra y se obtuvieron de la siguiente ecuación:

$$P_L = P_M - (P_{BS} + P_{BM}) \quad (\text{Ec. 4})$$

Los P_M son los μg de P liberados de la muestra, P_{BS} son los μg de P liberados del blanco de sustrato, P_{BM} son los μg de P liberados del blanco de muestra; 20 es un factor de conversión calculado como el inverso del volumen de muestra usado en la reacción enzimática expresado en mL (0,05 mL), FD es el factor de dilución inicial (antes de la reacción enzimática) o final (después de la reacción enzimática) de la muestra o el producto de ambos, t equivale al tiempo de incubación de la reacción enzimática (30 min) a 37°C, y 31 es el peso atómico del P. En los diferentes ensayos el FD fue variable antes de hacer la reacción enzimática o después de ella dependiendo de la muestra y del ensayo.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado para asegurar la precisión y reproducibilidad de los resultados.

3.7. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Los experimentos se llevaron a cabo en botellas de borosilicato de 250 o 500 mL, colocadas dentro de una cámara orbital modelo Stuart Shaking incubator SI500 (Figura 20). La cámara ofrece un movimiento de agitación orbital, ajustable entre 30 y 300 rpm. La velocidad de agitación es controlada por un microprocesador y se configura a través del panel de control LED digital. La temperatura de la cámara se ajusta mediante otra pantalla LED, donde el control del codificador asegura un rápido ajuste de temperatura, variando entre la temperatura ambiente +5°C y 60°C.

Durante los ensayos enzimáticos, las botellas se mantuvieron agitadas dentro de la cámara orbital a una velocidad constante de 250 rpm.

En estos ensayos se evaluó la evolución de la concentración del P-PO₄ en el interior de las botellas tras la adición de determinadas dosis de enzima, frente al control (sin adición de enzima).

Paralelamente, se realizó el seguimiento de la evolución de la concentración de N-NH_4 , dado su papel importante en el proceso de recuperación del P mediante cristalización en forma de estruvita.



Figura 20. Cámara orbital modelo Stuart Shaking incubator SI500.

El protocolo de puesta en marcha de cada ensayo se describe a continuación:

1. Se caracterizaron analíticamente tanto los sustratos, fango secundario y fango mezcla, como las enzimas, fitasas y celulolíticas, empleadas en cada ensayo enzimático. Para ello se determinaron los siguientes parámetros:
 - ✓ Concentración de sólidos totales y volátiles
 - ✓ Concentración de sólidos suspendidos totales y volátiles
 - ✓ Demanda química de oxígeno total y soluble
 - ✓ N total
 - ✓ P total
 - ✓ N amoniacal (N-NH_4)
 - ✓ P-PO_4
 - ✓ AGV de cadena corta (AGV)

- ✓ Alcalinidad (Alk)
 - ✓ pH y conductividad.
2. Cada botella de borosilicato se rellenó con un volumen determinado de sustrato (250 o 500 mL, según el ensayo correspondiente). Cada una de estas botellas es considerada un reactor, definido como un recipiente al que se le confieren las condiciones adecuadas para llevar a cabo cada uno de los ensayos. Estas condiciones son principalmente la temperatura del ensayo y la dosis de enzima a añadir en cada reactor.
 3. Se añadieron distintas dosis de enzima a cada reactor, determinadas en función de la densidad de la mezcla enzimática y el volumen de sustrato utilizado para cada ensayo. La mezcla de enzima comercial se conservaba refrigerada a 5°C, por lo que, antes de cada ensayo, el volumen de cóctel enzimático a utilizar se dejaba atemperar. En todas las tandas de ensayos realizados, se puso en marcha también un reactor control. En este no se realizaba la adición de dosis enzimática, con el fin de evaluar la evolución del P-PO₄ en este caso.

Además, en el caso concreto de los **ensayos realizados utilizando el fango secundario como sustrato**, adicionalmente se puso en marcha un ensayo control al que se añadió ácido acético. Esto se hizo con el objetivo de comprobar que la liberación de P-PO₄ era resultado de la hidrólisis enzimática y no de una degradación del Poly-P presente en el interior de las bacterias acumuladoras de polifosfato (PAO), asociadas al fango secundario, debido a un aporte extra de AGV (por parte de la enzima) que favoreciera este proceso de degradación.
 4. Después de completar los pasos previos y medir el pH y la conductividad de cada reactor, estos se introducían en la cámara orbital. En esta se mantenían el tiempo de ensayo y la temperatura seleccionada para cada uno de los ensayos, al mismo tiempo que se agitaban a una velocidad de 250 rpm.
-

5. Seguidamente, se realizaba un muestreo de cada reactor con una frecuencia de 2 horas hasta la finalización del ensayo, midiéndose el pH y las concentraciones de $P-PO_4$ y $N-NH_4$ en cada muestra recogida.

3.7.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS OPERACIONALES DE LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS

En este apartado se detallan las condiciones operacionales establecidas en los ensayos enzimáticos. Estos se han agrupado en función del tipo de sustrato utilizado y el tipo de enzima hidrolítica aplicada, diferenciando tres grupos de ensayos:

- I. Ensayos enzimáticos con fango secundario de la EDAR de Calahorra y enzimas fitasas (Lote de ensayos "S").
- II. Ensayos enzimáticos con fango mezcla de la EDAR de Calahorra y enzimas fitasas (Lote de ensayos "M").
- III. Ensayos enzimáticos con fango mezcla de la EDAR de Calahorra y enzimas celulolíticas (Lote de ensayos "C").

A continuación, se describen los parámetros operacionales establecidos para estos ensayos:

- 1) Temperatura:** Se realizaron pruebas a 23 y 35°C para seleccionar la temperatura óptima del proceso. La temperatura de 23°C se eligió por ser la mínima temperatura de operación posible en la cámara orbital y por su cercanía a la temperatura media anual en la cámara de mezcla de la EDAR de Calahorra, lo que no implicaría un gran consumo energético a escala industrial. Sin embargo, a esta temperatura no se observaron mejoras significativas en la liberación de P, lo que motivó la evaluación a 35°C. Esta temperatura coincide con la del fango al ser introducido en el digestor anaerobio, de modo que no sería necesario un calentamiento adicional si la etapa enzimática se realizara justo antes de la digestión. Además, se buscaba comprobar si el incremento de temperatura mejoraba la actividad enzimática, teniendo en cuenta que en la cámara de mezcla siempre se producen ciertas pérdidas de eficiencia. Por tanto, el ensayo a 35°C
-

se planteó como una opción realista y energéticamente viable para su integración en línea con el proceso de digestión anaerobia.

- 2) Duración:** La duración de los ensayos se estableció entre 8 y 22 horas, intervalo que abarca los tiempos de operación habituales en las cámaras de mezcla de EDAR, que suelen oscilar entre 8 y 24 horas. Se trabajó con un tiempo máximo de 22 horas, ya que este corresponde al tiempo real de permanencia del fango espesado en la cámara de mezcla de la EDAR de Calahorra. Esta elección responde a un enfoque de investigación aplicada, orientado a evaluar la viabilidad del proceso sin necesidad de modificaciones en la instalación existente. Así, el tiempo máximo considerado representaría el periodo efectivo de actuación de las enzimas sobre el fango en condiciones reales de operación.
- 3) Dosis:** El proveedor de las enzimas fitasa recomendó una dosis óptima de 100 g de enzima añadida por kg de fango seco. No obstante, se consideró que dicha dosis, aunque útil como referencia teórica, podría resultar excesiva y poco viable en un contexto de aplicación a escala real, tanto por costes económicos como por la logística de manejo de enzimas en grandes volúmenes. Por este motivo, se planteó un rango de ensayo que incluyera desde un 0,5 % hasta el 100 % de la dosis indicada, con el objetivo de evaluar la efectividad de dosis más bajas que pudieran ser operativamente realistas. Esta estrategia permitió identificar posibles puntos de equilibrio entre rendimiento del proceso y viabilidad técnica y económica. En la Tabla 7 se recogen los diferentes reactores puestos en marcha, junto con sus respectivas dosis de enzima fitasa.
-

Tabla 7. Dosificación de enzimas fitasa en los diferentes reactores ensayados.

Etiqueta del reactor	Dosis enzimática (g de enzima añadida·kg ⁻¹ fango)	Comentarios
R0	0	Control (sin enzima añadida)
R0+HAc	0	Adición de una solución de acético tamponado
R0.5	0,5	0,5% de la dosis recomendada
R1	1	1% de la dosis recomendada
R6	6	6% de la dosis recomendada
R15	15	15% de la dosis recomendada
R25	25	25% de la dosis óptima
R50	50	50% de la dosis óptima
R75	75	75% de la dosis óptima
R100	100	100% de la dosis óptima

Adicionalmente, se realizaron ensayos de forma puntual destinados a evaluar el efecto del pH en el proceso. Ambos se describen a continuación:

- (1) En uno de ellos, se tamponó el medio de los reactores con adición de enzima. Para ello, se añadió un volumen determinado de bicarbonato de sodio a los reactores con adición de enzima. Esto se hizo concretamente tras observar caídas de pH durante los primeros ensayos, especialmente significativas en los reactores con dosificación enzimática. Con el medio tamponado se pretendía observar si, por un lado, era posible mantener el pH de los reactores con adición enzimática en el intervalo óptimo indicado por el proveedor (ver Tabla 5 y Tabla 6), y por otro, si con ello era posible obtener mejores rendimientos en cuanto a la liberación de P-PO₄ al medio.

- (2) En el otro se realizó un ajuste de pH a los reactores con adición enzimática. Para ello se utilizó una solución concentrada de sosa cáustica (NaOH). Así, tras medir el pH de los reactores durante los muestreos del ensayo, se adicionó un cierto volumen de NaOH a los reactores con dosificación enzimática, con el objetivo de llevar el pH de cada uno al intervalo óptimo indicado por el proveedor (ver Tabla 5 y Tabla 6).

A continuación, se presentan las condiciones operacionales para cada lote de ensayos:

Tabla 8. Condiciones operacionales de los ensayos correspondientes al lote “S” de ensayos.

Ensayos	Reactores							Temperatura	Duración	Comentarios
								°C	horas	
S1	R0		R25		R50			23	10	-
S2	R0		R25		R50			35	8	-
S3	R0	R25		R50	R75		R100	35	8	-
S4	R0	R0+Hac	R25_T	R50_T	R75_T	R100_T	R100	35	8	Los reactores R25_T, R50_T, R75_T y R100_T se tamponaron.
S5	R0	R0+Hac		R25	R50		R75	23	22	
S6	R0	R0+Hac		R25	R50		R75	35	22	Se ajustó el pH de los reactores con adición enzimática c/2 horas.
S7	R0	R0+Hac		R25	R50		R75	35	22	-

Tabla 9. Condiciones operacionales de los ensayos correspondientes al lote “M” de ensayos.

Ensayos	Reactores					Temperatura	Duración	Comentarios		
						°C	horas			
M1	R0	R0+Hac	R25	R50	R75	35	22	-		
M2	R0	R0+Hac	R25	R50	R75	35	22	-		
M3	R0		R50		R75	35	22	Se ajustó el pH de los reactores con adición enzimática c/2 horas.		
M4	R0		R25	R50		R75	35	22	-	
M5	R0		R1	R25		R50	35	22	-	
M6	R0		R25	R50		R75	35	22	-	
M7	R0		R1		R25		35	22	-	
M8	R0		R1		R25		R50	35	22	Se utilizó como sustrato fango secundario procedente del ensayos M7.
M9	R0	R0.5	R1	R6	R25	R50	35	22	-	
M10	R0		R6		R25		R50	35	22	-
M11	R0		R6		R25		35	22	-	
M12	R0		R6		R15	R25	R50	35	22	-
M13	R0		R6		R15	R25	R50	35	22	-

Tabla 10. Condiciones operacionales de los ensayos correspondientes al lote "C" de ensayos.

Ensayos	Reactores					Temperatura	Duración	Comentarios
						°C	horas	
C1	R0		R0+Hac		R75	35	22	-
C2	R0	R0+Hac	R25	R50	R75	35	22	-

Tal y como puede observarse en la Tabla 8, los ensayos correspondientes al lote “S” se realizaron a dos temperaturas: 23°C (en el caso de los ensayos S1 y S5) y 35°C (para el resto de los ensayos). Al mismo tiempo, en los ensayos del S1 al S4 puede observarse una duración total del experimento de 8-10 horas al tratarse de pruebas preliminares en las que las variables de operación, como la del tiempo experimental, estaban siendo testeadas. No obstante, tras estos primeros ensayos se incrementó el tiempo experimental de 8 a 22 horas. En cuanto a la temperatura, tras analizar los resultados correspondientes al ensayo S1 se decidió incrementarla hasta los 35°C. Esto se hizo con el fin de evaluar si era posible la obtención de mejores resultados de liberación de fosfato. Seguidamente, en el ensayo S5 se decidió combinar las variables de operación de 23°C y 22 horas. En este caso, se buscó comprobar si el aumento en la liberación de P-PO₄ (observado en los ensayos previos S2, S3 y S4) se mantenía prologando más el tiempo de ensayo, a pesar de disminuir la temperatura. Al analizarse los resultados obtenidos para este ensayo, se decidió establecer como condiciones operativas para los siguientes lotes de ensayo (lote “M” y lote “C”) una temperatura de 35°C durante 22 horas (ver Tabla 9 y Tabla 10).

En cuanto a las dosis de enzima utilizadas en los ensayos, cabe mencionar dos aspectos:

- 1) En el caso de los ensayos realizados con enzimas fitasas (lote “S” y lote “M”), se realizó un barrido de pruebas con dosis de enzimas desde un 0,5% hasta un 100% de la dosis óptima indicada por el proveedor (100 g enzima·kg⁻¹ fango b.h).
 - 2) En el caso de los ensayos realizados con enzimas celulolíticas (lote “C”), al tenerse una dosis óptima indicada por el fabricante (15 g enzima·kg⁻¹ fango b.h) del mismo orden de magnitud que las pruebas realizadas con enzimas fitasas al 25%, 50% y 75%, se decidió hacer uso de estos mismos porcentajes en los ensayos del lote “C”. Esto se hizo con el fin de que se pudiesen comparar los resultados obtenidos en todos los lotes de ensayos realizados.
-

3.7.2. CÁLCULOS

En este apartado se definen las variables que permitirán hacer una discusión de los resultados obtenidos en los ensayos posteriormente: el P disponible, el grado de hidrólisis del fango, y el rendimiento del proceso además de la liberación neta de P debida a la enzima.

1. Concentración de P orgánico disponible en el sustrato de cada ensayo ($P_{org\ disponible}$)

$$P_{org\ disponible} = P_T - PO_4\ libre - PO_4\ asociado\ al\ poly-P \quad (Ec. 5)$$

Esta variable representa la concentración de P orgánico disponible en el sustrato del ensayo respectivo. Se obtiene de la diferencia entre las concentraciones de P_T y del P medido como P- PO_4 ($PO_4\ libre$). En el caso del fango secundario también se ha de restar el fosfato asociado al Poly-P de las bacterias PAO ($PO_4\ asociado\ al\ poly-P$) presentes en el fango. Este último se obtiene de la concentración de fosfato liberada en el reactor R0+HAc a un tiempo corto (< 1h), que es prácticamente nula para todos los experimentos.

2. Liberación neta de P- PO_4 por efecto de adición de las enzimas ($\Delta PO_4\ ENZIMA$)

$$\Delta PO_4\ ENZIMA = \Delta PO_4\ REACTOR\ ENZIMÁTICO - \Delta PO_4\ REACTOR\ R0 \quad (Ec. 6)$$

Donde:

- ✓ $\Delta PO_4\ REACTOR\ ENZIMÁTICO$ es la acumulación de fosfato en el reactor con adición de enzima a tiempo final del ensayo. Se calcula a partir de la diferencia de concentraciones de P- PO_4 en el reactor enzimático entre $t = t_{final}$ y $t = 0$ h.
- ✓ $\Delta PO_4\ REACTOR\ R0$ es la acumulación de fosfato en el reactor sin adición de enzima (R0) a tiempo final del ensayo. Se calcula a partir de la diferencia de concentraciones de P- PO_4 en el reactor blanco entre $t = t_{final}$ y $t = 0$ h.

Se calcula como la diferencia entre ambas acumulaciones de fosfato, de la cual se obtiene la liberación de fosfato por acción únicamente de las enzimas hidrolíticas.

3. Eficacia de liberación de P-PO₄ por efecto de la adición enzimática

$$Eficacia (\%) = \frac{\Delta PO_4 ENZIMA}{P_{org\ disponible}} \cdot 100 \text{ (Ec. 7)}$$

Se calcula como el cociente entre la cantidad de P-PO₄ liberado por acción de las enzimas fitasa y el P orgánico disponible presente en el sustrato utilizado. Este cociente se multiplica por 100, obteniéndose el porcentaje de fosfato hidrolizado por enzimas hidrolíticas con respecto a la cantidad total de P orgánico disponible en el sustrato.

En el caso de los ensayos en lo que se utiliza patrón de ácido fítico como sustrato, el cálculo se realiza de la siguiente forma:

$$Eficacia (\%) = \frac{\Delta PO_4 ENZIMA}{P_{phytasa}} \cdot 100 (\%) \text{ (Ec. 8)}$$

Donde P_{phytasa} es el P disponible en forma de ácido fítico en la disolución patrón de ácido fítico, cuya preparación se describe en el apartado 3.5, siendo este término 330 µg P_{phytase} /mL.

4. Grado de hidrólisis del sustrato

$$\%P_{org\ hidrolizado} = \frac{P_T - P_{org\ disponible}}{P_T} \cdot 100 (\%) \text{ (Ec. 9)}$$

Se calcula como la diferencia entre el contenido de P_T presente inicialmente en la muestra y la cantidad de P_{org disponible}, dividida por el contenido total inicial de P_T y multiplicada por 100. El resultado permite estimar qué proporción del P orgánico ya se encontraba previamente hidrolizada y por lo tanto no está disponible para su hidrólisis.

3.7.3. METODOS ANALÍTICOS

Sólidos totales (ST), volátiles (SV), suspendidos (SST) y suspendidos volátiles (SSV)

Para la determinación de sólidos se empleó la metodología gravimétrica propuesta en el Standard Methods (APHA, 2022).

La concentración de ST se determina mediante la eliminación de la humedad, a 105°C, de una muestra sin filtrar. Después de someter los ST a una temperatura de 550°C, la pérdida de peso se debe a los SV. La concentración de SST y la de SSV se determina mediante la aplicación del método expuesto para el caso de los ST, sobre una muestra filtrada a través de un filtro de policarbonato de 0,45 µm. El incremento de peso del filtro se corresponde con los SST.

Demanda química de oxígeno (DQO)

La determinación de la DQO se realizó mediante el método descrito en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2022).

Esta medida se realizó en función de las distintas corrientes del sistema, se llevó a cabo utilizando diferentes métodos en función de su contenido en material particulado. La DQO de las muestras con un elevado contenido en material particulado se determinó mediante el método del reflujo abierto (APHA, AWWA, WEF 2022), mientras que la DQO de las muestras solubles o con bajo contenido en material particulado, se determinó mediante el método colorimétrico (APHA, 2022).

DQO – método de reflujo abierto

Este método resulta adecuado para muestras heterogéneas, dado que emplea un mayor volumen. Consiste en la oxidación de la materia orgánica con dicromato mediante digestión con reflujo abierto. Este test se lleva a cabo por calentamiento, bajo condiciones de reflujo total, de un determinado volumen de muestra con un exceso conocido de $K_2Cr_2O_7$, en presencia de H_2SO_4 al 96%. El periodo de reflujo estándar es de 120 minutos a 150°C. La reacción es catalizada con Ag_2SO_4 , y se utiliza $HgSO_4$ para eliminar posibles interferencias con los haluros presentes. El exceso de $K_2Cr_2O_7$ se valora con sal de Mohr por medio de valoración potenciométrica redox en un valorador automático

Metrohm 702 SM Titrino (Suiza). Es necesario incluir un blanco, usando agua desionizada, para valorar la sal de Mohr y considerar las posibles interferencias de los reactivos empleados. Así mismo, se realiza la primera medida de DQO con una muestra patrón, que debe tener una concentración aproximadamente de 500 ppm.

DQO – método colorimétrico (0-125 ppm)

Este método resulta más económico (dado que se emplean menos reactivos) y genera una menor cantidad de residuos peligrosos que el método del reflujo abierto. Este método resulta adecuado para muestras homogéneas, en las que el volumen de muestra empleado no es decisivo para la obtención de resultados reproducibles. Aunque es necesario realizar diluciones de las muestras que contengan una DQO alta, ya que con el equipo usado (Spectroquant PHARO 300 de Merk, Alemania) el rango de medición se encuentra entre 0 y 125 mg·L⁻¹.

Este método se basa en la absorción de luz a diferentes longitudes de onda de las especies Cr³⁺ y Cr⁶⁺. La muestra es llevada al digestor durante 2 horas y a 150°C. Se somete a reflujo en una solución ácido fuerte con un exceso de dicromato. El ion dicromato (Cr₂O₇²⁻) oxida la materia con DQO, reduciéndose desde Cr⁶⁺ hasta Cr³⁺. Ambas especies son coloreadas, pero absorben a diferentes longitudes de onda. El ion dicromato absorbe fuertemente en la región de los 400 nm, donde la absorción del Cr³⁺ es mucho menor. Por el contrario, el Cr³⁺ absorbe en la región de 600 nm, donde el ion dicromato presenta una absorción cercana a cero. De esta manera, después de la digestión, el dicromato no reducido se cuantifica para determinar la cantidad de dicromato consumido. Se usa sulfato de plata (Ag₂SO₄) como catalizador para la oxidación de compuestos alifáticos lineales. El consumo de oxígeno se obtiene mediante una recta de calibrado, en la que se introducen las medidas obtenidas de absorbancia a una longitud de onda de 446 nm.

Nutrientes

Las concentraciones de PO₄ y NH₄ fueron determinadas siguiendo la metodología propuesta en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2022) implementados en un analizador automático multiparamétrico (Smartchem 200 de AMS/Alliance Instruments, Italia).

El análisis del P_T se realizó por los métodos 4500-P-B y 4500-P-F, ya que requiere de una previa digestión ácida de la muestra para su determinación, y el $P-PO_4$ se determinó según el método 4500-P-F (APHA, 2022). El método consiste en la determinación del ión fosfato por la reacción del molibdato amónico y el tartrato de antimonio y potasio, que forman un complejo de antimonio-fosfomolibdato en medio ácido, que se reduce con el ácido ascórbico a un azul intenso en función de la concentración de fosfato. Posteriormente, se mide la absorbancia a 880 nm y se determina la concentración de fosfato mediante comparación con una curva de calibrado.

Para el análisis del N total (N_T) se utilizó el test de determinación de N_T de la firma Merck. Los compuestos orgánicos e inorgánicos de N se oxidan hasta nitratos mediante la digestión ácida en un termoreactor por el método de Koroleff. Estos nitratos con 2,6-dimetilfenol (DMP), en solución sulfúrica y fosfórica forman el compuesto 4-nitro-2,6-dimetil-fenol que se determina fotométricamente a 338 nm empleando un espectrofotómetro marca Spectroquant PHARO 300 de Merk (Alemania).

Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

Para la determinación de la concentración de AGV, expresados en $mg\ CH_3COOH \cdot L^{-1}$, y de la alcalinidad, expresada en $mg\ CaCO_3 \cdot L^{-1}$ se utilizó el método de valoración ácido-base de 5 puntos propuesto por (Moosbrugger, 1992). El método consiste en la valoración de la muestra con un volumen de HCl, de concentración conocida y próxima a 0,1 N, hasta alcanzar valores de pH de 6,7, 5,9, 5,2 y 4,3. Se realizó la medida usando un valorador automático potenciométrico (DMS Tritino 716, Metrhom, Suiza), programa informático distribuido por los propios autores del método analítico, basado en el equilibrio químico de las especies involucradas, tomando en cuenta no solo los AGV y los carbonatos, sino también el $P-PO_4$, el $N-NH_4$ y los sulfuros, que se presentan comúnmente como ácidos/bases débiles en el agua.

3.8. ESTUDIO DEL POTENCIAL DE BIOMETANIZACIÓN TRAS LA ADICIÓN DE ENZIMA

Con el fin de evaluar la biodegradabilidad anaerobia de las enzimas y su contribución a la producción de biogás al ser añadidas al sustrato de interés, se llevaron a cabo ensayos de potencial de biometanización (*en inglés: Biochemical Methane Potential, BMP*). Para ello, se empleó un sistema Automatic Methane Potential Test System (AMPTS), el cual mide el flujo neto de metano mediante un método volumétrico.

El equipo AMPTS utilizado se compone de los siguientes elementos: un baño termostático, 15 reactores anaerobios de 500 mL de capacidad equipados con motores de agitación individuales, 15 botellas de fijación de CO₂ de 80 mL y una unidad de medida de desplazamiento de volumen con 15 canales, conectada a un ordenador mediante el software específico del equipo (ver Figura 21).

Para la realización de los ensayos de biometanización, se utilizó como **inóculo** fango procedente del proceso de digestión anaerobia de la EDAR de Calahorra. Como **sustratos** se emplearon los contenidos de los reactores R0, R25 y R50 correspondientes al ensayo M7, tras las 22 horas experimentales, así como enzimas fitasa utilizadas de forma aislada para evaluar su potencial de biodegradación.



Figura 21. Equipo AMPTS.

Se trabajó con una **relación inóculo:sustrato (I/S) de 2**, basada en los sólidos volátiles (SV) del fango anaerobio y la DQO de los sustratos. Esta relación asegura una alta actividad microbiana, reduciendo

el riesgo de sobrecarga e inhibición. Para mantener dicha relación, en algunos casos fue necesario ajustar la cantidad de inóculo mediante la adición de sobrenadante de la centrífuga, seleccionado por poseer una matriz similar a la de los sustratos (presencia de N, P, entre otros), lo que permitía su uso como diluyente sin aportar DQO adicional al sistema.

La **temperatura de incubación** se fijó en **35°C**, y el **periodo de incubación** fue de **20 días**, siguiendo las condiciones de operación de los digestores anaerobios de la EDAR de Calahorra.

A continuación, se describen los distintos tipos de reactores puestos en marcha en los ensayos BMP, diseñados con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de enzimas sobre la producción de biogás, así como de discriminar la contribución individual del sustrato, el inóculo y la propia enzima al potencial de biometanización observado:

- **BMP R. Enz.:** contienen fango resultante de los ensayos enzimáticos R25 y R50 tras 22 horas de incubación.
- **BMP Blanco R.Enz.:** controles para determinar el potencial de biometanización atribuido únicamente al inóculo de los reactores R25 y R50.
- **BMP FM:** evalúan el potencial de biometanización del fango original (R0_R25 y R0_R50) utilizado en los ensayos R25 y R50, sin adición de enzimas.
- **BMP Blanco FM:** controles para descontar el potencial de biometanización asociado al inóculo en R0_R25 y R0_R50.
- **BMP Enz.:** reactores a los que se añadió únicamente la cantidad de enzima correspondiente a la DQO introducida en los ensayos R25 y R50.
- **BMP Blanco Enz.:** controles que permiten conocer el potencial de biometanización asociado solo al inóculo que se ha puesto en los reactores BMP Enz.

En la Tabla 11 se detalla la configuración experimental empleada, incluyendo los volúmenes de sustrato, inóculo y enzima utilizados.

Tabla 11. Distribución y composición de los reactores ensayados para la determinación del BMP.

Dosis	Nombre	Volúmenes Sustrato		Volúmenes Inóculo		Volúmenes Enzima	
		Fango tras ensayo enzimático	Sobrenadante centrífuga	Fango de digestión anaerobia	Sobrenadante centrífuga	Enzimas fitasas	Sobrenadante centrífuga
g enz·kg ⁻¹ fango (b.h.)		mL	mL	mL	mL	mL	mL
25	BMP R.Enz	39	0	361	0		
	BMP Blanco R. Enz	0	39	361	0		
	BMP FM	39	0	284	77		
	BMP Blanco FM	0	39	284	77		
	BMP Enz			83	278	1	38
	BMP Blanco Enz			83	278	0	39
50	BMP R.Enz	33	0	367	0		
	BMP Blanco R. Enz	0	33	367	0		
	BMP FM	33	0	239	127		
	BMP Blanco FM	0	33	239	127		
	BMP Enz			137	230	1	32
	BMP Blanco Enz			137	230	0	33

3.9. ENCAPSULACIÓN ENZIMÁTICA

A continuación, se describen los procedimientos empleados para la encapsulación enzimática de las fitasas, seleccionadas en función de los resultados obtenidos en los lotes de ensayos enzimáticos realizados. El objetivo de encapsular estas enzimas consistió en evaluar su comportamiento durante determinados ensayos enzimáticos, comparándose principalmente los resultados de liberación de P-PO₄ obtenidos frente a la aplicación de enzimas de forma libre. Así mismo, se pretendía determinar si mediante la encapsulación enzimática era posible conseguir la reutilización de las fitasas en múltiples ciclos de ensayos. Esto permitiría disminuir la cantidad de enzima necesaria para liberar el ácido fítico presente en el sustrato de estudio (fango mezcla). Como resultado, se optimizaría el uso de las fitasas, lo que no solo mejoraría la eficiencia del proceso, sino que también reduciría los costos asociados a su producción y aplicación.

Para llevar a cabo las encapsulaciones enzimáticas se utilizaron tres metodologías distintas: **sol-gel**, **spray drying** y **polimerización en masa**, descritas a continuación.

3.9.1. MÉTODO SOL-GEL

PRUEBAS PRELIMINARES

Tras una revisión bibliográfica sobre el uso de citosano en la preparación de productos sol-gel, incorporando enzimas hidrolíticas al proceso, se realizaron las primeras pruebas. En los artículos científicos revisados la encapsulación de este tipo de enzimas se enfocaba en la obtención de nanosensores o electrodos (Essel et al., 2018; Pierre, 2004; Zou et al., 2008).

En función de lo observado en bibliografía, para las pruebas preliminares se prepararon tres disoluciones en las que se disolvieron cantidades crecientes de citosano en una disolución de acético glacial al 2% v/v. A continuación, se detalla la composición de cada una de las disoluciones de prueba:

1. **Disolución CS1:** acético glacial 2% v/v, citosano 1%w/v.
 2. **Disolución CS2:** acético glacial 2% v/v, citosano 0,33%w/v.
 3. **Disolución CS3:** acético glacial 2% v/v, citosano 3%w/v.
-

Estas disoluciones se mantuvieron en agitación durante 24 horas. Tras este periodo, y en base a su comportamiento físico (viscosidad, solubilidad y homogeneidad), se seleccionó la disolución CS1 como base para continuar con los experimentos posteriores.

En segundo lugar, se prepararon las disoluciones enzimáticas que posteriormente se pretendían incorporar a la disolución de citosano, seleccionada (CS1). Estas disoluciones se prepararon teniendo en cuenta la necesidad de diluir la enzima en una solución tampón fosfato salino (en inglés: *Phosphate-Buffered Saline*, PBS). De esta forma los cambios de pH que puedan estar implícitos en la formación del sol-gel no afectarían a priori a la actividad enzimática. Así, se prepararon dos disoluciones con distintas cantidades de enzima, con el objetivo de evaluar si dicho parámetro influía en la formación del material SOL-GEL:

- i. **Disolución ENZ1:** 300 µl enzima fitasa, la disolución se enrasa con solución tamponada PBS hasta 5 ml.
- ii. **Disolución ENZ2:** 100 µl enzima fitasa, la disolución se enrasa con solución tamponada PBS hasta 5 ml.

En tercer lugar, se procedió a disolver la disolución de citosano (CS), seleccionada previamente, en el disolvente orgánico tetraetil ortosilicato (TEOS). Esta mezcla se hizo con una proporción CS:TEOS 1:1.

En cuarto y último lugar, se procedió a mezclar la disolución CS:TEOS (1:1) obtenida con las disoluciones enzimáticas ENZ1 y ENZ2, respectivamente. De esta forma, se elaboraron las mezclas que se detallan a continuación:

- a) 250 µl CS:TEOS (1:1) + 250 µl ENZ1
- b) 250 µl CS:TEOS (1:1) + 250 µl ENZ2

Estas mezclas fueron vertidas por separado en dos soportes poliméricos, cada uno de ellos compuesto por tres pocillos en los que se distribuye cada mezcla.

Con el objetivo de realizar un escaneo más exhaustivo, se prepararon distintas mezclas variando tanto la proporción entre quitosano y disolvente orgánico como el tipo de disolvente empleado. En este caso, se utilizaron TEOS y 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), en proporciones 1:1 y 1:3 con respecto al quitosano. Además, se consideró fundamental ajustar el pH de las mezclas hasta un valor compatible con la actividad de las enzimas fitasas ($\text{pH} \approx 5$), ya que estas formulaciones pueden presentar una acidez elevada que comprometería su aplicabilidad. Para favorecer la hidrólisis del sistema, se añadieron unas gotas de HCl al 37% a las mezclas quitosano-disolvente orgánico. A continuación, se detalla la composición de las mezclas preparadas:

1. 250 μl CS:TEOS (1:1) + 250 μl ENZ1
2. 250 μl CS:TEOS (1:1) + 250 μl ENZ2
3. 250 μl CS:APTES (1:1) + 250 μl ENZ1
4. 250 μl CS:APTES (1:1) + 250 μl ENZ2
5. 250 μl CS:TEOS (1:3) + 250 μl ENZ1
6. 250 μl CS:TEOS (1:3) + 250 μl ENZ2
7. 250 μl CS:APTES (1:3) + 250 μl ENZ1
8. 250 μl CS:APTES (1:3) + 250 μl ENZ2

Siguiendo el mismo procedimiento que antes, cada mezcla se colocó en distintos pocillos poliméricos Dura. Posteriormente, se dejaron reposar durante 24 horas para observar los resultados de la interacción o formación del material.

ENCAPSULACIONES PARA EVALUACIÓN EN ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Tras los ensayos preliminares realizados, se continúa hacia la elaboración de un producto sol-gel con un mayor contenido de enzimas fitasas. Para ello se sigue la misma metodología que la detallada para este método en las pruebas preliminares. Lo que varía significativamente son los volúmenes necesarios de cada disolución. Una vez obtenido el producto sol-gel, con la correspondiente dosis enzimática encapsulada en este, se procede a incorporarlo en los ensayos enzimáticos. De esta manera, se pretende estudiar comparativamente la acción de la enzima fitasa en su forma libre y encapsulada, respectivamente.

A continuación, se detalla cada una de las formulaciones de encapsulación realizadas.

R25 PASTILLAS #1 y R25 PASTILLAS #2

Se prepararon las siguientes diluciones:

- i. Disolución de citosano
 - Citosano: 1%w/v
 - Ácido acético glacial: 2%v/v
- ii. Disoluciones CS:TEOS
 - CS:TEOS (3:1)
 - CS:TEOS (1:1)
 - Se añadieron unas gotas de HCl 37% a la disolución CS:TEOS para promover la hidrólisis.
- iii. Disolución enzimática
 - Dosis de enzimas fitasas utilizada: R25.
 - Disolución enrasada con buffer acetato: el PBS utilizado originalmente en las pruebas preliminares se cambia por un buffer de acetato para que el P-PO₄ contenido en el PBS no interfiera en las mediciones de este compuesto en los ensayos enzimáticos.
- iv. Disolución final
 - **R25 PASTILLAS #1:** 125 ml disolución CS:TEOS (3:1) + 125 ml disolución enzimática.
 - **R25 PASTILLAS #2:** 125 ml disolución CS:TEOS (1:1) + 125 ml disolución enzimática.

Ambas disoluciones finales se distribuyeron en pocillos de plástico, dejándose evaporar el disolvente orgánico durante 120 horas.

R25 GEL#1 y R25 GEL #2

Se prepararon las siguientes disoluciones:

- i. Disolución de citosano
 - Citosano: 1%w/v
 - Ácido acético glacial: 2%v/v
-

- ii. Disoluciones CS:TEOS
 - CS:TEOS (3:1)
 - CS:TEOS (1:1)
 - Se añadieron unas gotas de HCl 37% a la disolución CS:TEOS para promover la hidrólisis.
- iii. Disolución enzimática
 - Dosis de enzimas fitasas utilizada: R25.
 - Disolución enrasada con buffer acetato.
- iv. Disoluciones finales:
 - **R25 GEL#1:** 125 ml disolución CS:TEOS (1:1) + 125 ml disolución enzimática (a.).
 - **R25 GEL #2:** 125 ml disolución CS:TEOS (3:1) + 125 ml disolución enzimática (a.).

Las tres disoluciones finales se distribuyeron en pocillos de porcelana, dejándose evaporar el disolvente orgánico durante 8 horas mediante secado forzado a una temperatura de 120°C.

Una vez finalizada la obtención de todos los productos encapsulados mediante método sol-gel, se procedió a su introducción en respectivos ensayos enzimáticos. A continuación, en la Tabla 12 se detallan los aspectos principales de estos ensayos.

Tabla 12. Condiciones operacionales de los ensayos correspondientes al lote “I-SG1” e “I-SG2” de ensayos.

Ensayos	Reactores		Temperatura	Duración
	Enzima libre	Enzima encapsulada	°C	horas
I-SG1	R0	-	35	22
	R25	PASTILLAS R25#1		
		PASTILLAS R25#2		
I-SG2	R0	-	35	22
	R25	GEL R25#1		
		GEL R25#2		

3.9.2. MÉTODO SPRAY-DRYING

PRUEBAS PRELIMINARES

Tras una revisión bibliográfica sobre el uso de citosano (CS) en el proceso de spray drying, incorporando enzimas hidrolíticas (Estevinho et al., 2013, 2014, 2015; Mosén et al., 2006; Santa-Maria et al., 2012; Tajber et al., 2009), se da comienzo a las pruebas preliminares. Para ello, se preparan en primer lugar dos disoluciones de prueba:

1. 500 ml CS:TEOS (1:1) + 500 ml ENZ1
2. 500 ml CS:TEOS (1:3) + 500 ml ENZ1

Cabe mencionar que, siguiendo la misma metodología descrita en el método sol-gel (ver apartado 3.9.1), las disoluciones CS:TEOS se elaboraron a partir de una disolución CS1 (1%w/v CS; 2%v/v acético) y del disolvente orgánico TEOS. Ambos reactivos se mezclan en las proporciones indicadas (1:1; 1:3), añadiéndose unas gotas de HCl 37% para facilitar la hidrólisis y proporcionándoles agitación continua durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se procede a someter estas disoluciones al proceso de spray-drying, haciendo uso de un equipo spray-dryer disponible en las instalaciones de la UV. Con este ensayo se pretende estudiar las condiciones de trabajo más adecuadas para llevar a cabo el proceso de spray drying.

ENCAPSULACIONES PARA EVALUACIÓN EN ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Tras los ensayos preliminares, se procedió a la elaboración del producto enzimático encapsulado mediante spray-drying, con el objetivo de emplearlo en ensayos enzimáticos específicos. En función de los resultados obtenidos previamente, se optó por utilizar la disolución CS2 (0,33% w/v CS; 2%v/v acético) como base para la formulación. Esta elección respondió a la necesidad de trabajar con una disolución de menor viscosidad, lo que permitiría evaluar más adecuadamente la viabilidad del paso de la mezcla a través del equipo de spray-dryer y evitar posibles obstrucciones durante el proceso.

A continuación, se detalla cada una de las formulaciones de encapsulación realizadas.

R50-SD #1

Se prepararon las siguientes disoluciones:

- i. Disolución de citosano
 - Citosano: 0,33%w/v
 - Ácido acético glacial: 2%v/v
- ii. Disoluciones CS:TEOS
 - CS:TEOS (1:1)
 - Se añaden unas gotas de HCl 37% a la disolución CS:TEOS para facilitar la hidrólisis.
- iii. Disolución enzimática
 - Dosis de enzimas fitasas utilizada: R50
 - Disolución enrasada con buffer acetato
- iv. Disolución final
 - **R50-SD #1:** 250 ml disolución CS:TEOS(1:1) + 250 ml disolución enzimática.

La disolución final se procesó por el equipo de spray-drying a un caudal de aire de 10 ml/min, siendo este el máximo caudal que se consigue alcanzar en el equipo sin que el producto se pegue a las paredes y dificulte su posterior recuperación. El caudal de aire al que se realiza el secado por atomización de la disolución define de forma directa el tamaño de partícula que se obtiene.

R50-SD #2 y R50-SD #3

Se prepararon las siguientes disoluciones:

- i. Disolución de citosano
 - Citosano: 1%w/v
 - Ácido acético glacial: 2%v/v
 - ii. Disoluciones CS:APTES
 - CS:APTES (1:1)
 - CS:APTES (3:1)
 - Se añaden unas gotas de HCl 37% a la disolución CS:TEOS para facilitar la hidrólisis.
 - iii. Disolución enzimática
 - Dosis de enzimas fitasas utilizada: R50
-

- Disolución enrasada con buffer acetato
- iv. Disolución final
 - **R50-SD #2**: 250 ml disolución CS:APTES(1:1) + 250 ml disolución enzimática.
 - **R50-SD #3**: 250 ml disolución CS:APTES (3:1) + 250 ml disolución enzimática.

Ambas disoluciones finales se procesaron en el equipo de spray-drying, por separado, a un caudal de aire de 10 ml/min.

R25-SD #4 y R50-SD #5

Se prepararon las siguientes disoluciones:

- i. Disolución de citosano
 - Citosano: 1%w/v
 - Ácido acético glacial: 2%v/v
- ii. Disolución enzimática
 - a. SD#4
 - Dosis de enzimas fitasas utilizada: R25
 - Disolución enrasada con buffer acetato
 - b. SD#5
 - Dosis de enzimas fitasas utilizada: R50
 - Disolución enrasada con buffer acetato
- iii. Disolución final
 - **R25-SD #4**: 250 ml disolución de citosano+250 ml disolución enzimática (a).
 - **R50-SD #5**: 250 ml disolución de citosano++250 ml disolución enzimática (b).

Ambas disoluciones finales se procesaron por el equipo de spray-drying, por separado, a un caudal de aire de 10 ml/min.

Todos los productos enzimáticos obtenidos mediante el método spray drying se emplearon en ensayos enzimáticos específicos, cuyas condiciones operacionales se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones operacionales de los ensayos correspondientes al lote “I” de ensayos.

Ensayos	Reactores		Temperatura	Duración
	Enzima libre	Enzima encapsulada	°C	horas
I-SD1	R0	-	35	22
	R50	R50-SD #1		
I-SD2	R0	-	35	22
	R50	R50-SD #2		
		R50-SD #3		
I-SD3	R0	-	35	22
	R25	R25-SD#4		
	R50	R50-SD#5		

3.9.3. MÉTODO POLIMERIZACIÓN EN MASA

PRUEBAS PRELIMINARES

Con el objetivo de desarrollar un sistema de inmovilización enzimática alternativo, se seleccionó la poliacrilamida (PAAm) como material base para la elaboración de los soportes. Así, para el proceso de obtención de los soportes de PAAm, se partió inicialmente de una composición ya establecida según estudios previos en los que se logró inmovilizar la enzima catalasa (I. Martí, 2022). Esta se fue variando para alcanzar las mejores condiciones para la encapsulación, obteniéndose finalmente la composición que se describe en Tabla 14.

Tabla 14. Composición de partida para obtener los soportes de inmovilización de las enzimas.

Composición de partida de los soportes de acrilamida	
Reactivos	Peso (g)
Acrilamida	1,07
MBA	0,021
KPS	0,041
Span 80	0,03-0,06
Disoluciones de enzima	2,00

Como se describe en esta tabla, en los soportes de acrilamida se encapsularon diferentes **diluciones en agua estéril del cóctel comercial de enzimas fitasa** a proporciones de **1/1, 1/5 y 1/10**. Cada una de ellas, junto con su respectiva réplica, se colocó en una cavidad de la placa de porcelana (ver Figura 22).

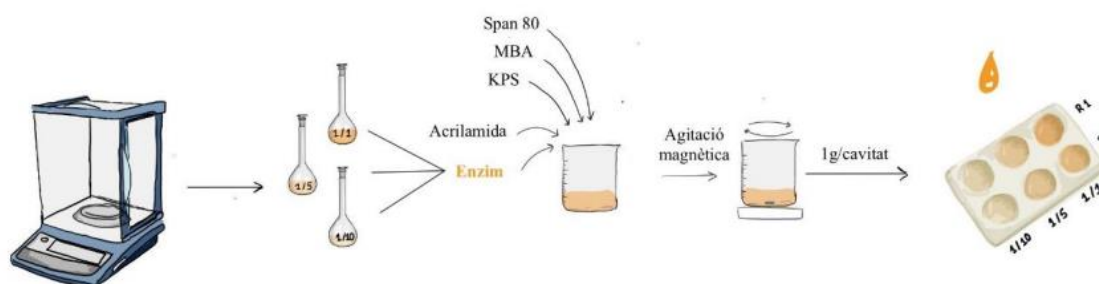


Figura 22. Esquema del procedimiento. Preparación de soportes para polimerización en masa con atrapamiento de la enzima fitasa en placas de porcelana (Fuente: Cerdà Esquivá, 2023).

Los resultados de la polimerización en placas de porcelana se presentan en la Figura 23, observándose una consistencia compacta.



Figura 23. Resultados de pruebas de polimerización en masa en placas de porcelana.

ENCAPSULACIONES PARA EVALUACIÓN EN ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Una vez observadas las propiedades de polimerización observadas en las pruebas realizadas en placa de porcelana, se procedió a utilizar viales como moldes, siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 24. Igual que en las pruebas preliminares, se probaron cargas enzimáticas 1/1, 1/5 y 1/10. El objetivo fue obtener soportes en forma de disco con un diámetro adecuado.

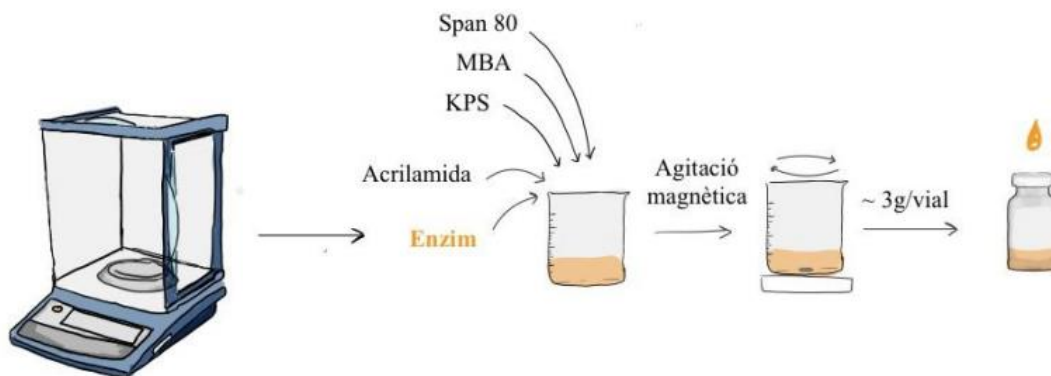


Figura 24. Esquema del procedimiento. Preparación de soportes para polimerización en masa con atrapamiento de la enzima fitasa en viales (Fuente: Cerdà Esquiva, 2023).

Durante la agitación magnética se aplicó una temperatura de calentamiento de 40°C, intentando controlar que la temperatura de la mezcla no superara los 30°C (ver Figura 25).

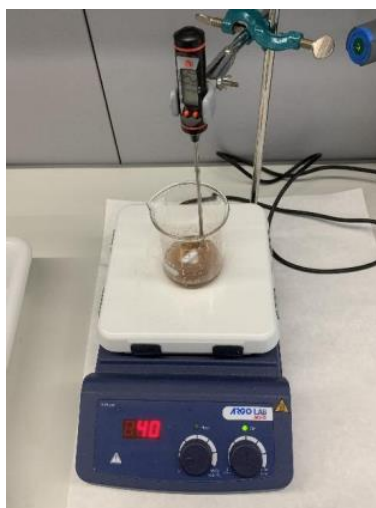


Figura 25. Agitación magnética con calefacción a 40°C. Monitorización de la temperatura de la mezcla durante la agitación.

El tiempo de calentamiento se mantuvo hasta la disolución total de los componentes sólidos de la mezcla. A continuación, se transfirió la mezcla al vial y se realizó un pesaje final del contenido de este.

A partir de un estudio previo, se seleccionó una **relación enzimática 1:1** como carga óptima para la formulación. Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se procedió a la producción de los productos enzimáticos encapsulados, los cuales fueron posteriormente empleados en los ensayos enzimáticos.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la interpretación de los resultados de los ensayos enzimáticos llevados a cabo en la presente tesis se han utilizado como técnicas estadísticas el análisis de varianza y el coeficiente de correlación de Pearson.

La técnica de análisis de varianza (ANOVA) constituye la herramienta básica para el estudio del efecto de uno o más factores sobre la media de una variable continua. Es por lo tanto uno de los test estadísticos que se pueden emplear para comparar las medias de dos o más grupos. La hipótesis nula de la que parten los diferentes tipos de ANOVA es que la media de la variable estudiada es la misma

en los diferentes grupos (H_0), en contraposición a la hipótesis alternativa (H_A) de que, al menos dos medias, difieren de forma significativa. ANOVA permite comparar múltiples medias, pero lo hace mediante el estudio de las varianzas. La hipótesis nula (H_0) de que todas las observaciones proceden de la misma población (tienen la misma media y varianza) implica que la intervarianza y la intravarianza sean iguales. A medida que las medias de los grupos se alejan las unas de las otras, la intervarianza aumenta y deja de ser igual a la intravarianza. El ANOVA se realizó mediante el software Statgraphics versión 19.0.

El coeficiente de correlación de Pearson es el método de análisis que permite conocer la posible relación entre dos variables. El objetivo es indagar si los valores de una variable tienden a aumentar (o disminuir) a medida que aumentan (o disminuyen) los de la otra, o si por el contrario no tienen nada que ver entre sí. El grado de asociación entre dos variables numéricas puede cuantificarse mediante el cálculo de un coeficiente de correlación. Éste mide el grado de asociación lineal entre dos variables cualesquiera, y puede calcularse dividiendo la covarianza de ambas entre el producto de las desviaciones típicas de las dos variables.

Para un conjunto de datos, el coeficiente de correlación de Pearson puede tomar cualquier valor entre -1 y +1. El valor del coeficiente será positivo si existe una relación directa entre ambas variables, esto es, si las dos aumentan al mismo tiempo. Por el contrario, será negativo si la relación es inversa, es decir, cuando una variable disminuye a medida que la otra aumenta. Un valor de +1 ó -1 indicará una relación lineal perfecta entre ambas variables, mientras que un valor de 0 indicará que no existe relación lineal entre ellas.

Para valorar la significación del coeficiente de correlación y confirmar la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables, una vez obtenido el coeficiente de correlación debe realizarse un test de hipótesis basado en la distribución t de Student. Estudiar la significación estadística del coeficiente de correlación es, en definitiva, determinar si el coeficiente es estadísticamente diferente de cero (H_0 : no hay correlación real).

3.11. SIMULACIÓN DEL PROCESO

Para la realización de este trabajo se ha utilizado el software DESASS desarrollado por el grupo de investigación CALAGUA (Ferrer et al., 2008). DESASS es un simulador de estaciones depuradoras de aguas residuales diseñado y optimizado para la investigación de los procesos de eliminación de materia orgánica y nutrientes. Este programa permite evaluar esquemas completos de tratamiento incluyendo tanto la línea de agua como la de fangos, pudiéndose representar desde sistemas tan sencillos como la eliminación de materia orgánica, hasta procesos más complejos en los que se incorporan los esquemas de eliminación biológica de N y P, fermentación de fango primario, digestión de fangos y reactores biológicos de membrana. DESASS tiene implementado un algoritmo de modelación matemática consistente en una ampliación del modelo biológico general BNRM2 (Barat et al., 2013).

La Figura 26 muestra la ventana principal del programa DESASS con el esquema de tratamiento de la EDAR de Calahorra. Las líneas azules representan las corrientes de agua, las líneas rojas representan las corrientes de fango y las líneas verdes representan la recirculación de fangos. Por último, las líneas moradas representan las corrientes de biogás.

Antes de proceder al cálculo de cualquier esquema de tratamiento introducido en la interfaz del programa DESASS, se deben establecer el caudal y las características principales del agua residual afluente a la EDAR, así como los criterios de diseño de cada uno de los elementos de tratamiento. En la Figura 27, en la pestaña *Cargas*, se puede observar la ventana en la que se han de introducir las cargas contaminantes del agua residual a tratar. La obtención de dichos valores a partir de las campañas de muestreo realizadas entre 2018 y 2019, se detallan en el apartado 4.2.1 En la pestaña *Dotaciones y Temperatura*, se introducirían los parámetros de caudal medio, caudal punta y temperatura.

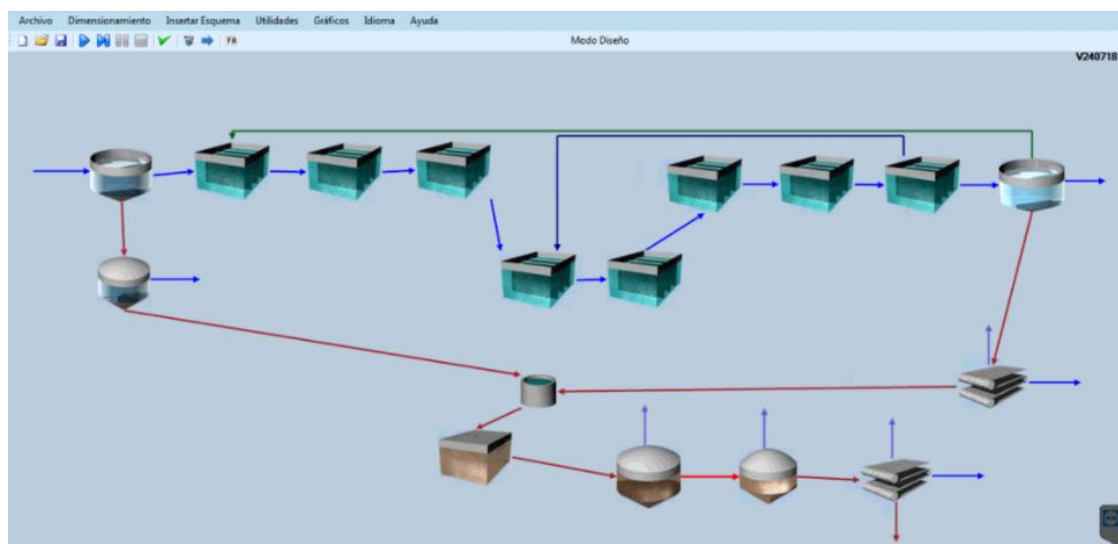


Figura 26. Diagrama de flujo de la EDAR de Calahorra del programa DESASS.

Dotaciones y Temperatura | **Cargas** | Sedimentabilidad | Precipitados

	Soluble (mg/l)		
	Invierno	Verano	
So2			mgDQO/l
Sf	411.24	411.24	mgDQO/l
Sa	80.00	80.00	mgDQO/l
Snh4	22.30	22.30	mgN/l
Sno3	0.71	0.71	mgN/l
Sno2			mgN/l
Spo4	2.08	2.08	mgP/l
Si	3.76	3.76	mgDQO/l
Salk	252.40	251.92	mgCaCO3/l
Sn2	14.78	14.78	mgN/l
Spro			mgDQO/l
Sh2			mgDQO/l
Sch4			mgDQO/l
Sco2	0.78	0.78	mmol C/l
Sca	141.20	141.20	mg/l
Smg	27.60	27.60	mg/l
Sk	30.90	30.90	mg/l
Sfe			mg/l
Sal			mg/l
Sso4	109.48	109.48	mgS/l
Shs			mgS/l

	Suspendida (mg/l)		
	Invierno	Verano	
Xi bm			mgDQO/l
Xio	248.28	248.28	mgDQO/l
Xs	42.72	42.72	mgDQO/l
Xh			mgDQO/l
Xpao	1.00	1.00	mgDQO/l
Xpp			mgP/l
Xpha			mgDQO/l
Xamm			mgDQO/l
Xamm-r			mgDQO/l
Xnit			mgDQO/l
Xana			mgDQO/l
Xacid	1.00	1.00	mgDQO/l
Xpro			mgDQO/l
Xmac			mgDQO/l
Xmh2			mgDQO/l
Xneoh			mg/l
Xnep			mg/l
Xsrb-h			mgDQO/l
Xsrb-a			mgDQO/l
Xss	179.40	179.40	mg/l
Xnv	26.70	26.70	mg/l

☒ Sin Curva de Datos
☐ Agua Residual Doméstica
☐ Con Datos Analíticos

Figura 27. Ventana del programa DESASS para la introducción de datos, tales como el caudal y las cargas contaminantes del agua residual a tratar.

Para cada elemento de tratamiento el programa dispone de una ventana donde se introducen los criterios de diseño correspondientes, en el caso de realizar un nuevo diseño, o las dimensiones de

los elementos construidos, en el caso de realizar simulaciones sobre una EDAR existente. La Figura 28 muestra, a modo de ejemplo, la ventana en la que se establecen los criterios de diseño del reactor de fangos activados. En este caso, para que el programa pueda calcular el funcionamiento del sistema, se deben establecer los siguientes parámetros: el volumen útil del reactor, el tiempo de retención celular, la concentración de oxígeno, el porcentaje de volumen que representa la cámara en cuestión (en la pestaña de *Geometría*) y el método utilizado para el cálculo de los coeficientes de transferencia de gases (en la pestaña de *Aireación; Maq. Auxiliar*). Cada elemento de tratamiento dispone de una pantalla similar a la mostrada en la Figura 28, donde se introducen las dimensiones y/o los criterios de diseño.

Generales | Geometría | Aireación; Maq. Auxiliar | Control

☐ Fijar temperatura

☒ Criterio de diseño por tiempo retención celular

Tipo de tanque

Tanque anaerobio ▼

☐ Optimizar fangos activados

O.D. y Recirculación

O.D. | Rec.Sale | Rec.Entra

Ox. Disuelto (mg/l)

a Qmedio	0.00	2
a Qpunta	0.00	1

Diseño con Volumen prefijado

Criterio Tiempo Retención Celular

Volumen Total Reactores (m3)	15254.40
TRC Invierno (días)	21.38000
TRC Verano (días)	21.38000

Cinética

☒ Calcular Precipitación

☒ Sin Condicion Inicial

☐ Utilizar Solución Anterior

☐ Incluir Reactor BABE

Datos Iniciales

Aceptar

Cancelar

Figura 28. Ventana del programa DESASS para la introducción de los criterios de diseño correspondientes al reactor biológico.

Debido al gran número de ecuaciones a resolver, el programa realiza un cálculo iterativo hasta que alcanza la solución correspondiente al estado estacionario. Cuando la diferencia entre las concentraciones de todos los componentes del modelo entre dos iteraciones consecutivas es inferior al criterio de convergencia establecido el programa da por finalizado el cálculo.

En todo momento el programa permite visualizar las características de cada una de las corrientes. La información visualizada se muestra en la Figura 29. Los botones de listado que aparecen en dicha pantalla permiten exportar esa información a archivos Excel. Así mismo, el programa DESASS también permite visualizar de forma gráfica la evolución durante el cálculo de las concentraciones de los distintos componentes del modelo en cualquiera de los elementos de tratamiento.

Caudal/Solubles		Invierno	Verano
Caudales (m3/d)			
Medio	12683.39		
Punta	18740.28		
Pluvial	18740.28		
Concentrac.			
mgDQO/l	Sf	411.25	
mgDQO/l	Sa	80.04	
mgDQO/l	Spro	0.02	
mgDQO/l	Si	3.76	
mgN/l	Snh4	22.31	
mgN/l	Sno3	0.71	
mgN/l	Sno2	0.00	
mgN/l	Shno2	0.00	
mgP/l	Spo4	2.08	
mgS/l	Sso4	109.48	
mgDQO/l	Stoths	0.00	
mgDQO/l	Sch4	0.00	
mmol C/l	Sco2	0.78	
mgDQO/l	Sh2	0.01	
mgN/l	Sn2	14.78	
mgN/l	Snh3	0.10	
mgN/l	Sh2s	0.00	
mgDQO/l	Ox. dis.	0.00	
°C	Temp.	19.30	
mgCaCO3/l	Salk	246.7	

Figura 29. Ventana del programa DESASS donde se muestran las características de las distintas corrientes (ej: entrada al reactor biológico).

Para llevar a cabo las simulaciones del funcionamiento actual y de los escenarios alternativos de la EDAR de Calahorra, fue necesario caracterizar tanto el agua residual afluente como las corrientes principales de la EDAR, calibrar y validar el modelo BNRM2 y definir los nuevos escenarios enfocados a maximizar la recuperación de P. Estas etapas se describen a continuación.

1. Caracterización de las aguas residuales

Con el fin de disponer de una base sólida para la simulación, se contó con dos campañas exhaustivas de caracterización de las corrientes principales de la EDAR. La primera fue realizada por la EDAR de Calahorra en octubre de 2018, y la segunda por el grupo CALAGUA en diciembre de 2019. Estos estudios permitieron conocer de forma detallada las características del agua de entrada y de las distintas corrientes internas de la planta.

Para obtener estas caracterizaciones se determinaron los siguientes parámetros: DBO límite soluble y suspendida, DQO soluble y suspendida, SST y SSV, AGV, pH, alcalinidad, N-NH₄, nitrato, N_T soluble y suspendido, P-PO₄, P_T soluble y suspendido. Estas analíticas se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.7.3. Así mismo, fue necesario conocer el caudal medio y la temperatura del agua residual afluente a la EDAR.

A partir de estos valores, fue posible caracterizar el agua afluente según el modelo BNRM2, lo cual resultó esencial para llevar a cabo tanto la calibración como la validación del modelo en la simulación. Para ello, se utilizaron las ecuaciones que se presentan a continuación:

$$S_I = DQO_S - DBO_S \quad (Ec. 10)$$

$$S_A = AGV \quad (Ec. 11)$$

$$S_F = DBO_S - AGV \quad (Ec. 12)$$

$$X_S = DBO - DBO_S \quad (Ec. 13)$$

$$X_I = (DQO - DQO_S) - (DBO - DBO_S) \quad (Ec. 14)$$

Cabe mencionar que, en el caso de la calibración (en la que se hizo uso de la caracterización de 2018), se identificó que el cálculo del parámetro S_I según la (Ec. 10) no es adecuado, ya que no permitía reproducir los valores históricos de la DQO efluente. Por ello, se optó por estimar S_I a partir de datos analíticos del efluente, utilizando la (Ec. 15).

$$S_I = DQO_{S,efl} - DBO_{S,efl} \quad (Ec. 15)$$

De este modo, el resto de las fracciones de la materia orgánica se calculan con las siguientes expresiones:

$$S_A = AGV \quad (Ec. 16)$$

$$S_F = DQO_S - S_A - S_I \quad (Ec. 17)$$

$$X_I = DQO_T - DBO_T - S_I \quad (Ec. 18)$$

$$X_S = DQO_T - DQO_S - X_I \quad (Ec. 19)$$

Para describir adecuadamente los procesos biológicos y fisicoquímicos en el modelo, fue necesario aplicar ecuaciones de conservación de masa, las cuales permiten asegurar que no se pierde ni se crea materia de forma arbitraria a lo largo de las reacciones. En particular, se utilizan ecuaciones de conservación de N, P y sólidos suspendidos para cuantificar cómo estos elementos se redistribuyen entre las distintas fracciones del modelo durante los procesos de hidrólisis, crecimiento microbiano, lisis, entre otros.

La correcta aplicación de estas ecuaciones requiere conocer el contenido elemental de cada componente del modelo. Los valores correspondientes a los componentes cuya fórmula es conocida (acético, propiónico, N-NH₄, nitrato, N y P) se obtienen por estequiometría, los valores correspondientes a la biomasa se obtienen asumiendo que su composición química es C₅H₇O₂NP_{0,2}, mientras que para el resto de los componentes se calculan a partir de determinaciones analíticas del agua afluyente (ver de (Ec. 20) a (Ec. 23)).

$$NKT_{sol} = S_{NH} + S_F \cdot i_{NSF} + S_I \cdot i_{NSI} \quad (Ec. 20)$$

$$NKT_{susp} = X_S \cdot i_{NXS} + X_I \cdot i_{NXI} + (X_{ACID} + X_{AUT} + X_H + X_{PAO}) \cdot i_{NBM} \quad (Ec. 21)$$

$$P_{sol} = S_{PO4} + S_F \cdot i_{PSF} + S_I \cdot i_{PSI} \quad (Ec. 22)$$

$$P_{susp} = X_S \cdot i_{PXS} + X_I \cdot i_{PXI} + (X_{ACID} + X_{AUT} + X_H + X_{PAO}) \cdot i_{PBM} + X_{PP} \quad (Ec. 23)$$

siendo: i_{NSI} : contenido en nitrógeno de S_I ($\text{gN} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{NSF} : contenido en N de S_F ($\text{gN} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{NXI} : contenido en N de X_I ($\text{gN} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{NXS} : contenido en N de X_S ($\text{gN} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{NBM} : contenido en N de la biomasa ($\text{gN} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{PSI} : contenido en P de S_I ($\text{gP} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{PSF} : contenido en P de S_F ($\text{gP} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{PXI} : contenido en P de X_I ($\text{gP} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{PXS} : contenido en P de X_S ($\text{gP} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

i_{PBM} : contenido en P de la biomasa ($\text{gP} \cdot \text{gDQO}^{-1}$)

El cálculo de los sólidos suspendidos se realiza de forma análoga al de los coeficientes estequiométricos del amonio, fósforo y alcalinidad, siendo necesario conocer el contenido en sólidos suspendidos de todos los componentes particulados del modelo (ver (Ec. 24)). El contenido en sólidos de X_{PHA} y X_{PP} se calcula a partir de la fórmula estequiométrica considerada, el contenido en sólidos de todos los grupos de microorganismos se calcula asumiendo que su composición es $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{NP}_{0.2}$, mientras que para la materia orgánica se calcula a partir de determinaciones analíticas del agua afluyente (Ec. 25) y (Ec. 26).

$$SST = X_I \cdot i_{SSTXI} + X_S \cdot i_{SSTXS} + (X_{ACID} + X_{AUT} + X_H + X_{PAO}) \cdot i_{SSTBM} + X_{PHA} \cdot 0.6 + X_{PP} \cdot 3.23 \quad (\text{Ec. 24})$$

$$SSVB = X_S \cdot i_{SSTXS} + (X_{ACID} + X_{AUT} + X_H + X_{PAO}) \cdot i_{SSTBM} + X_{PHA} \cdot 0.6 \quad (\text{Ec. 25})$$

$$SSVNB = X_I \cdot i_{SSTXI} \quad (\text{Ec. 26})$$

siendo: i_{SSTXI} : contenido en sólidos suspendidos de X_I (g SS/g DQO)

i_{SSTXS} : contenido en sólidos suspendidos de X_S (g SS/g DQO)

i_{SSTBM} : contenido en sólidos suspendidos de la biomasa (g SS/g DQO)

2. Calibración del modelo BNRM2

A partir de los datos obtenidos en la campaña de octubre de 2018, se procedió a la calibración del modelo BNRM2, ajustando los resultados simulados a los datos experimentales obtenidos en los diferentes puntos de muestreo de la EDAR. Para ello, se definió el conjunto de parámetros estequiométricos y cinéticos específico con el fin de reproducir con precisión la caracterización observada en dicha campaña para cada unidad operacional. Se prestó especial atención a la precisión en la simulación de la línea de fangos, ya que esta sirvió como base para el análisis de nuevos escenarios de la EDAR orientados a maximizar la recuperación de P en etapas previas a la digestión anaerobia.

Los parámetros estequiométricos, que definen las relaciones entre los distintos componentes involucrados en los procesos microbianos, no dependen de la temperatura, por ser relaciones entre los distintos componentes de la reacción. En cambio, los parámetros cinéticos, que describen la velocidad de los procesos biológicos, sí se ven fuertemente influenciados por la temperatura, presentando variaciones significativas en función de esta.

Por ello, el valor de todos los parámetros cinéticos se calcula inicialmente a una temperatura de referencia de 20°C, que corresponde aproximadamente a la temperatura ambiente habitual en la EDAR de Calahorra. Para obtener los valores de estos parámetros a otras temperaturas, se aplica la ecuación de Arrhenius (Ec. 27), que permite estimar la variación de la velocidad de los procesos biológicos en función de la temperatura.

$$K(T) = K(20^{\circ}\text{C}) \cdot \vartheta^{(T-20)} \quad (\text{Ec. 27})$$

En el caso de los decantadores, el modelo incluye las zonas de clarificación, sedimentación y compresión del fango, de forma que se pueden obtener no sólo las concentraciones del efluente y de la recirculación de fangos, sino también el perfil de concentraciones en el decantador. De esta manera, se puede conocer la posición del manto de fangos en cada momento y la capacidad de almacenamiento de fangos del decantador.

Según este modelo global, para obtener la velocidad de sedimentación de un fango en el decantador en función de la concentración de sólidos existente en cada zona del mismo, se deben conocer los siguientes parámetros para ese fango:

- V_O ($m \cdot h^{-1}$): Máxima velocidad de sedimentación zonal.
- V_{Smax} ($m \cdot h^{-1}$): Máxima velocidad de sedimentación efectiva.
- r_h ($m^3 \cdot g^{-1}$): Parámetro característico de la sedimentación zonal.
- r_p ($m^3 \cdot g^{-1}$): Parámetro característico de la sedimentación floculada.
- f_{ns} : Fracción no sedimentable de los sólidos en la entrada.

En este caso, y debido a la falta de datos experimentales específicos, se recurrió a valores orientativos dentro del rango habitual reportado para EDAR urbanas (Barat et al., 2013).

3. Validación del modelo

Una vez calibrado el modelo, se llevó a cabo su validación empleando los datos obtenidos en la caracterización de diciembre de 2019 y los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en la calibración del modelo.

4. Simulación de escenarios alternativos para la recuperación de P

Con el modelo calibrado y validado, se evaluaron distintos escenarios alternativos a la línea de fangos actual con el objetivo de maximizar la recuperación de P antes de la digestión anaerobia, SIN y CON aporte de enzimas hidrolíticas.

3.12. ANÁLISIS ECONÓMICO

El análisis económico se centró en la evaluación de los escenarios alternativos a la línea de fangos actual, planteados en el apartado anterior. Para su realización, debe tenerse en cuenta que los datos experimentales utilizados se han obtenido durante un periodo de varios meses sujeto a variaciones tanto en las características del agua afluente como en algunos parámetros de operación de la EDAR. Esta variabilidad dificulta la comparabilidad de resultados entre los distintos escenarios estudiados.

No obstante, para intentar minimizar dicha variabilidad, el tratamiento de consumos y costes se ha normalizado respecto a los m³ de agua tratada en la EDAR y también respecto a los kg de P afluentes a la misma.

El análisis de costes se ha centrado fundamentalmente en la recuperación de P en forma de estruvita en la EDAR. Para ello, se han recopilado datos relativos a la de operación de la EDAR tanto operando con sistema de recuperación de P como sin él. Los escenarios analizados se centran específicamente en el proceso de cristalización del P-PO₄ recuperado a partir de los efluentes potencialmente enriquecidos en este compuesto, generados en los distintos escenarios para maximizar la recuperación de P (CON hidrólisis enzimática y SIN hidrólisis enzimática).

Para los escenarios con recuperación de P sin aporte de enzima (escenarios SIN hidrólisis enzimática) se han analizado los costes de implementación y operación a partir de los datos experimentales obtenidos durante los periodos de estudio experimental en la EDAR de Calahorra. Para los escenarios que implicaban el aporte de enzima (escenarios CON hidrólisis enzimática) se ha realizado un estudio de costes teórico, dado que no se han probado experimentalmente, a partir de la información experimental obtenida para los escenarios SIN hidrólisis enzimática (PHORWater, s. f.) y a partir de simulaciones realizadas para los escenarios CON hidrólisis enzimática.

En la Tabla 15 se presentan los valores de los ratios de operación de la planta piloto de cristalización de la EDAR de Calahorra, los cuales se emplearán para estimar los consumos y la producción de estruvita por metro cúbico de agua tratada.

Los ratios empleados para la cristalización de estruvita fueron obtenidos en el marco del proyecto PHORWater, s. f., en el que se estudiaron los parámetros que influyen en el proceso de cristalización, tanto en distintos puntos del esquema convencional de la EDAR de Calahorra como en condiciones controladas en un reactor independiente.

Tabla 15. Ratios de operación de la planta piloto de cristalización de la EDAR de Calahorra.

Parámetros	Valores	Unidades
<i>Ratios cristalización estruvita</i>		
Estruvita producida	0,49-0,62	kg·m ⁻³ sob
	0,062	kg P·m ⁻³ sob
Energía	1,48	kwh·m ⁻³ sob
NaOH	6,52	kg NaOH·kg ⁻¹ P
MgCl ₂	8,17	kg MgCl ₂ ·kg ⁻¹ P
HRT cristalizador	0,26	d
<i>Costes cristalizador estruvita</i>		
Coste cristalizador		
<i>Infraestructura</i>	17.591,8	€ m ⁻³ capacidad
<i>Instrumentación</i>	18.132	€
<i>Amortización</i>	10	años
<i>Coste gestión del fango</i>		
Coste fango (b.h.)	14	€·Tn ⁻¹ (b.h)
<i>Costes de reactivos para cristalizar estruvita</i>		
Coste NaOH	620	€/Tn ⁻¹
Coste MgCl ₂	370	€·Tn ⁻¹
Coste Polielectrolito	2340	€·Tn ⁻¹
<i>Coste energético producción estruvita</i>		
Coste energía	0,2855	€·kWh ⁻¹
Precio estruvita	245	€·Tn ⁻¹
<i>Coste enzimas hidrolíticas</i>		
Coste enzima	1	€·kg ⁻¹

El **estudio económico se llevó a cabo en el año 2022**, por lo que todos los costes considerados corresponden a ese año como referencia. En este análisis se han incluido los siguientes componentes:

- **Infraestructura**, respecto a la inversión necesaria para llevar a cabo la implementación del sistema de recuperación de P únicamente se ha considerado el coste de construcción e instalación del cristalizador, al contar la EDAR de Calahorra con la mayoría del resto de elementos necesarios como bombas, conducciones, sistema de control y sensores para la elutriación en espesador de gravedad, para los Escenarios SIN aporte de enzima, y con la centrífuga para los Escenarios CON aporte de esta. Para calcular el coste de construcción del cristalizador se ha considerado un coste variable en función de los m³ de capacidad de cristalizador requeridos, relacionado con la infraestructura necesaria para su construcción; y luego, un coste fijo por reactor necesario que tiene en cuenta los sistemas de medición y control necesarios para la operación de cada unidad (PHORWater, s. f.). En el estudio se ha considerado que en todos los escenarios se precisa un único reactor de cristalización.
 - **Gestión del fango**, calculada a partir del coste proporcionado por la empresa explotadora de la EDAR de Calahorra (DAM) en el momento en el que se realizó el estudio (2022).
 - **Consumos de reactivo y energía**, valorados según los precios vigentes en 2022. Es importante señalar que estos costes pueden haber sufrido variaciones desde entonces, particularmente en el caso de la energía eléctrica, cuyo precio se incrementó significativamente en 2022 debido a la crisis energética derivada del conflicto con Rusia. Durante ese periodo, la tarifa eléctrica industrial 6.1 TD (1–30 kV) se situaba en un rango aproximado de 0,231 a 0,340 €/kWh.
 - **Precio de venta de la estruvita**: Para fijar el valor de la estruvita producida se han tenido en cuenta diferentes fuentes. Las estimaciones realizadas por algunos autores señalan que el valor de mercado de la estruvita está entre 188 y 763 €/Tn⁻¹, (Molinos-Senante et al., 2011). Otros autores fijan el precio de la estruvita en base al valor del material recuperado multiplicando la concentración de nutrientes en el producto por su valor común de mercado (P: 1,7 €/kg⁻¹, N: 1,1 €/kg⁻¹, Mg: 0,3 €/kg⁻¹, y Ca: 0,1 €/kg⁻¹) (Egle et al., 2016). Por otro lado, la
-

Unión Europea fijó un valor de 245 €·Tn⁻¹ para el momento del estudio (2022), que ha sido el valor utilizado en este estudio.

- **Aporte de enzima hidrolítica**, incluido en los escenarios correspondientes, con un coste estimado a partir del precio facilitado por el fabricante durante la fase de investigación (30 €·kg⁻¹ de enzima), ajustado posteriormente mediante un escalado teórico acorde a volúmenes de compra propios de una aplicación a escala industrial.
-

RESULTADOS

4. RESULTADOS

En este apartado se analizan y discuten los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de la tesis doctoral.

En primer lugar, se evaluó el efecto de la aplicación de dos tipos de enzimas hidrolíticas sobre los sustratos de estudio: fango secundario y fango de la cámara mezcla. Específicamente, se analizó su efecto sobre la liberación de $P-PO_4$ al medio, derivado de la hidrólisis del P orgánico presente en el sustrato. A partir de los resultados obtenidos en esta fase experimental, se definieron los parámetros de operación más relevantes del proceso: temperatura, tiempo de operación y dosis óptima de enzima. Asimismo, en base a estos resultados, se seleccionaron las dosis de enzima más prometedoras para ser posteriormente encapsuladas y evaluadas, con el objetivo de comparar su eficiencia con respecto a la aplicación de enzima libre.

En segundo lugar, se utilizó el programa DESASS para simular tanto el escenario actual de la EDAR de Calahorra como escenarios alternativos, que tenían como objetivo incrementar la efectividad en la liberación de fosfato. Para ello, en las simulaciones se plasmó el uso combinado de procesos de elutriación, que favorecieran la recuperación de P antes del proceso de digestión anaerobia, con la hidrólisis enzimática para recuperar P de la fracción orgánica, utilizando enzimas hidrolíticas. Para ello, se procedió primero a calibrar los parámetros biológicos y operacionales de la planta de Calahorra con el modelo BNRM2. Seguidamente, se validaron los parámetros obtenidos mediante el uso de datos experimentales procedentes de dos campañas de muestreo de la planta de Calahorra. Finalmente, se simularon en DESASS escenarios de la planta que permitiesen optimizar la liberación de fosfato en etapas previas a la digestión anaerobia.

Por último, a partir de los resultados obtenidos en los ensayos experimentales y los datos proporcionados por las simulaciones en el programa DESASS, se realizó un análisis económico y ambiental del proceso de adición de enzimas hidrolíticas para la recuperación del fosfato contenido en el P orgánico del fango de Calahorra.

4.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE OPERACIÓN PARA LA LIBERACIÓN DE P MEDIANTE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

A lo largo del presente apartado se presentan los resultados de los ensayos enzimáticos realizados con el propósito de evaluar la liberación de $P-PO_4$ al medio mediante la acción de enzimas hidrolíticas en estado libre e inmovilizadas actuando sobre los diferentes sustratos estudiados. Los experimentos realizados se han agrupado en los siguientes lotes de ensayos:

- LOTE “S”. Enzimas fitasas aplicadas sobre fango secundario
- LOTE “M”. Enzimas fitasas aplicadas sobre fango mezcla
- LOTE “C”. Enzimas celulolíticas aplicadas sobre fango mezcla
- LOTE “I”. Enzimas fitasas inmovilizadas aplicadas sobre fango mezcla

4.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO FÍTICO EN EL SUSTRATO DE ESTUDIO

Con el objetivo de cuantificar el contenido inicial de ácido fítico presente en la matriz de fango, se aplicaron dos metodologías complementarias: un método colorimétrico y un método instrumental mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), descrito en el apartado 3.4.

En una primera aproximación, se aplicó el método colorimétrico sobre el fango mezcla empleado en el ensayo M13. Los resultados obtenidos indicaron concentraciones de ácido fítico muy bajas, en el rango de 14 a 17 $mg \cdot L^{-1}$ (ppm). Esta baja señal sugiere que el método presenta una sensibilidad limitada frente a una matriz tan compleja como la del fango, posiblemente debido a interferencias con compuestos presentes en suspensión o a la baja eficiencia de extracción del compuesto objetivo.

Ante esta limitación, se optó por realizar un segundo análisis utilizando la técnica de HPLC-MS, aplicada a la misma muestra de fango. Como ejemplo, se presenta en la Figura 30 uno de los cromatogramas obtenido en las medidas por HPLC-MS.

No obstante, los resultados obtenidos mostraron una alta variabilidad, con concentraciones que oscilaron entre 367 ppm y 532 ppm, en función del pretratamiento aplicado a la muestra (centrifugación, uso de EDTA, digestión con ácido tricloroacético, entre otros). Esta dispersión pone de manifiesto la influencia decisiva del protocolo de preparación de muestra sobre la cuantificación del ácido fítico.

En conjunto, los datos obtenidos permiten concluir que la matriz del fango representa un entorno analítico especialmente complejo para la determinación precisa de ácido fítico. La presencia de sólidos en suspensión, materia orgánica coloidal y otros interferentes complica tanto la extracción eficiente del compuesto como su detección cuantitativa fiable, incluso mediante técnicas instrumentales avanzadas. Por tanto, los resultados de determinación de ácido fítico deben interpretarse con precaución, y sería recomendable seguir optimizando los procedimientos de pretratamiento para mejorar la reproducibilidad de este tipo de análisis.

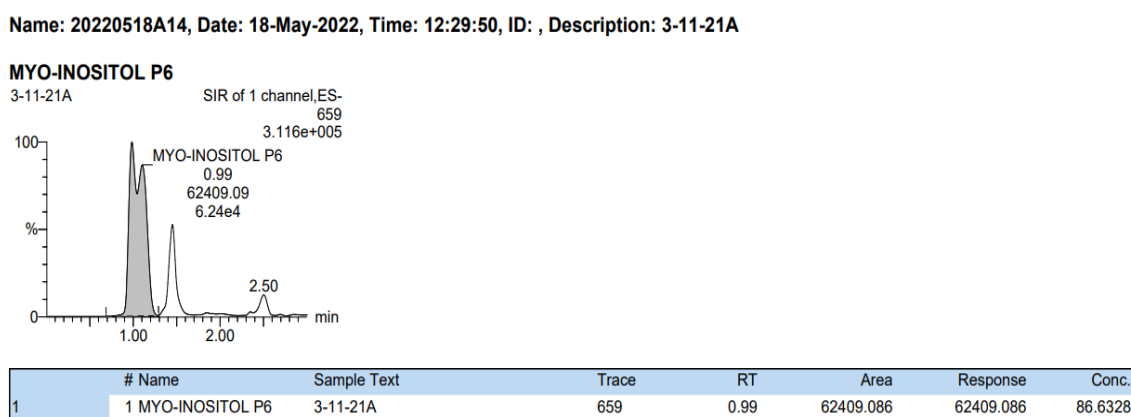


Figura 30. Cromatograma ejemplo de una de las muestras de fango medida para la determinación de ácido fítico mediante HPLC-MS.

4.1.2. ENSAYO DE REFERENCIA CON SUSTRATO PATRÓN DE ÁCIDO FÍTICO

La funcionalidad de la enzima fitasa en su forma libre se evaluó mediante un ensayo de referencia utilizando ácido fítico como sustrato estándar, conforme a la metodología descrita en el apartado 3.5. Para el ensayo se empleó una dosis equivalente al 25% de la recomendada por el fabricante como óptima. La incubación se realizó a una temperatura controlada de 35°C.

Los resultados se presentan en la Tabla 16, en el reactor control (R0_patrón) no se registró liberación neta de P, manteniéndose constante la concentración inicial de 35 mg P·L⁻¹ tras 72 horas, lo que confirma la **estabilidad del patrón de ácido fítico** en ausencia de enzima. En contraste, en el reactor tratado con enzima libre (R25_patrón), se observó una liberación neta de 357 mg P·L⁻¹, alcanzando una eficacia del 91 %.

Tabla 16. Ensayo de referencia para validar la actividad de la enzima libre empleando un patrón de ácido fítico como sustrato.

Reactor	P-PO ₄		ΔP-PO ₄	Eficacia
	0h	72h	mg P·L ⁻¹	%
	mg P·L ⁻¹			
R0_patrón	35	35	0	-
R25_patrón	35	392	299	91

Estos resultados confirman que la enzima en su forma libre es activa frente al sustrato de referencia, y establecen un punto de partida robusto para los ensayos posteriores con muestras reales de fango, donde la matriz es significativamente más compleja.

4.1.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS FITASAS

Se determinaron las actividades enzimáticas de dos lotes de enzimas fitasas, uno utilizado en el año 2019 y otro en el año 2020, ambos empleados posteriormente en los ensayos de hidrólisis enzimática. La determinación se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.6 de la metodología, con el fin de verificar que las enzimas utilizadas mantenían una actividad adecuada bajo las condiciones establecidas.

Los resultados obtenidos mostraron valores muy superiores al umbral mínimo de 60 U/mL indicado por el fabricante (ver Anejo 7.4), lo que confirma la alta funcionalidad de las enzimas en ambos lotes.

En concreto, el lote de 2019 presentó una actividad media de 975,18 U/mL, mientras que el lote de 2020 alcanzó una media de 808,61 U/mL.

Estas diferencias pueden estar relacionadas con la variabilidad entre lotes, el tiempo de almacenamiento o las condiciones de conservación. No obstante, los valores obtenidos en ambos casos garantizan la actividad de las fitasas y validan su uso en los ensayos posteriores para la liberación de ácido fítico en matrices complejas como los fangos de depuradora.

En resumen, la actividad enzimática determinada para ambos lotes asegura un buen rendimiento funcional y ofrece confianza en la fiabilidad de los resultados obtenidos en los ensayos experimentales.

4.1.4. LOTE DE ENSAYOS “S”: ENZIMAS FITASAS APLICADAS SOBRE FANGO SECUNDARIO

En este primer lote de ensayos se trabajó con enzimas tipo fitasa en forma libre aplicadas sobre fango secundario decantado. El estudio de aplicación de las enzimas se inició empleando fango secundario, dado que como se ha comentado anteriormente, el fango secundario contiene importantes cantidades de P orgánico asociado a la biomasa difícilmente extraíble antes de pasar por la etapa de digestión anaerobia. Así mismo, se realizaron los ensayos con fango decantado dado que las condiciones de operación de la EDAR de Calahorra impedían la toma de fango secundario espesado debido a que el espesamiento del fango se realizaba en una centrífuga en la cual el fango espesado se dirigía directamente a la cámara de mezcla sin pasar por un punto intermedio accesible. Por otro lado, desde el punto de vista operacional del proceso, el fango decantado presenta una menor concentración de sólidos lo que podría favorecer la difusión de las enzimas en la mezcla facilitando su acceso a los compuestos a hidrolizar.

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.7, para cada uno de los ensayos con fango secundario se llevó a cabo la caracterización físico-química tanto de las enzimas fitasas como del sustrato objeto de estudio, en este caso, fango secundario. Los resultados de estas caracterizaciones se presentan en la Tabla 17 y Tabla 18, respectivamente.

En cuanto a la caracterización del **sustrato**, se registró una concentración media de ST de $5.699 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, un valor razonable para un fango secundario no espesado. No obstante, en el ensayo S5 se observó un valor considerablemente superior, de $11.192 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que representa una desviación significativa respecto al promedio y sugiere una posible entrada puntual de sólidos de alta concentración o una toma de muestra menos representativa del comportamiento habitual del sistema. El aumento de ST se encuentra relacionado con un aumento en los SST, que incrementa de valores promedio en los anteriores ensayos de $1.883 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $5.180 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los SV mostraron un valor promedio de $3.807 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que representa un 71,4% de la fracción total. Esta elevada proporción de materia volátil es característica de fangos biológicos, en los que predomina la biomasa activa y los restos celulares. En el ensayo S5, de forma coherente con el elevado valor de ST, se registró también una concentración muy alta de SV ($8.188 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que indica que la carga puntual observada en ese caso concreto era mayoritariamente de origen orgánico. Por otro lado, en el ensayo S4 se observó una desviación en sentido opuesto, con un porcentaje de SV respecto a ST de solo un 48,1%, notablemente por debajo del promedio. Este valor sugiere una mayor proporción de sólidos disueltos inorgánicos o una menor presencia de biomasa en esa muestra específica, lo que podría estar relacionado con variaciones puntuales en la composición del fango o con un estado menos activo del sistema biológico en ese momento. No obstante, la segunda hipótesis no se sostiene al observar los valores de SST y %SSV, que se mantienen con respecto a los anteriores ensayos. Por lo tanto, la hipótesis más plausible es la entrada puntual de una mayor cantidad de materia inorgánica, posiblemente en forma de sólidos disueltos, al sistema de depuración. Este aporte explicaría el incremento en los ST sin un aumento correspondiente en los SST, lo que se traduce en una disminución relativa del porcentaje de SV. En concreto, se trataría de una subida de ST atribuible a la incorporación de sólidos disueltos inorgánicos, lo que altera la relación entre fracciones sin afectar significativamente la biomasa suspendida. No se descarta, no obstante, que este resultado pueda deberse también a un error puntual en la determinación analítica.

En cuanto a la concentración de SST, con un valor promedio de $3.296 \text{ mg SST}\cdot\text{L}^{-1}$, se observa una evolución creciente desde el ensayo S1 hasta el S7, siguiendo el orden cronológico de realización de los experimentos. Esta tendencia prolongada en el tiempo coincide con los meses de invierno, periodo en el que, según los registros operativos de la EDAR de Calahorra, se incrementa el tiempo

de retención celular (TRC) con el objetivo de mantener una capacidad nitrificante adecuada a pesar de las bajas temperaturas. Este aumento del TRC favorece la acumulación de biomasa y, por tanto, un incremento progresivo de la concentración de SST en el sistema.

En relación con el contenido en nutrientes del sustrato, se observa una concentración baja de N-NH_4 (valor promedio de $2,36 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$) como resultado del proceso biológico de nitrificación llevado a cabo en la EDAR. En el caso del P-PO_4 , se aprecia un valor promedio de $23 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$. Este valor se corresponde con un orden de magnitud superior al del N-NH_4 , lo que se relaciona con liberación de Poly-P durante el transporte, dado que se trata de un lodo procedente de una EDAR que cuenta con proceso EBPR. Por su parte, se registran concentraciones promedio de N_T y P_T de $294,8 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ y $175,5 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, valores relativamente altos, lo cual es típico en fangos secundarios y puede representar una buena carga potencial de nutrientes para recuperación. No obstante, el ensayo S4 también mostró valores significativamente más bajos en ambos parámetros: $9,6 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ para N_T y $56,1 \text{ P}\cdot\text{L}^{-1}$ para P_T , lo que refuerza la singularidad de esta muestra.

En cuanto a la DQO, se observa una alta carga orgánica total, con un valor promedio de $4.455 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$. Este resultado es coherente con las características de un fango secundario activo y concentrado, donde la elevada DQO se asocia principalmente al alto contenido de materia orgánica ligada a la biomasa presente en el fango. Sin embargo, en el ensayo S4 se detectó un valor considerablemente más bajo, de $1.730 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que representa una desviación significativa respecto al promedio. Se observa una concentración nula de AGV en el sustrato, lo cual se debe a que estos compuestos han sido previamente consumidos en el reactor de fangos activados. Esto es característico de un fango biológico procedente de un proceso BNR, donde los AGV son utilizados por los microorganismos tanto durante la degradación de la materia orgánica como en la eliminación biológica de P, especialmente por parte de las bacterias PAO.

Por último, el valor de pH promedio del sustrato se mantiene dentro de un intervalo óptimo ($6,5 - 8,5$) para favorecer la actividad de los microorganismos implicados en el proceso biológico.

Por su parte, en la caracterización realizada a la **enzima fitasa** se observan elevadas concentraciones de DQO_T , P-PO_4 y N-NH_4 . Así mismo, la concentración de AGV en las enzimas fitasas presenta un valor elevado (promedio de 2.245 ppm). Esto está relacionado con los procesos de obtención del cóctel enzimático comercial. Las enzimas fitasas comerciales a menudo presentan un contenido relativamente alto de ácido acético o ácido cítrico debido a la capacidad de estos para mejorar la estabilidad y la actividad de la enzima. Estos ácidos pueden ayudar a mantener la estructura tridimensional de la enzima y estabilizarla durante el almacenamiento y el procesamiento. En concreto, el ácido acético es un ácido débil que puede actuar como un tampón para mantener el pH adecuado para la actividad óptima de la enzima fitasa. Además, puede ayudar a prevenir la desnaturalización de la enzima y aumentar su vida útil. Como consecuencia, el valor promedio de pH obtenido es de 4,4. Por último, en cuanto a la concentración de ST y SST, se observa que, a pesar de tener un alto contenido de ST, su contenido en SST es bajo lo que le confiere al cóctel enzimático una consistencia líquida. Esto sugiere que las enzimas están mayormente disueltas o bien integradas en el líquido, lo que podría favorecer su actividad en soluciones acuosas donde la dispersión y la solubilidad son clave para la efectividad del proceso. Los valores de %SV y %SSV, 98,9% y 99,2% respectivamente, indican un elevado contenido en materia orgánica en el cóctel enzimático.

Tabla 17. Caracterización físico-química del sustrato fango secundario utilizado en el lote de ensayos "S".

Ensayos	Fecha	DQO _T	ST	SV	SV	SST	SSV	%SSV	AGV	N-NH ₄	P-PO ₄	N _T	P _T	pH
	DD/MM/AA	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	%	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	%	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	-
S1	03/07/19	4.860	5.426	3.834	70,7%	1.773	1.601	90,3%	0	3,9	48,5	N/A	N/A	6,9
S2	04/07/19	4.860	5.426	3.834	70,7%	1.773	1.601	90,3%	0	3,9	48,5	N/A	N/A	6,9
S3	25/07/19	4.740	5.799	4.072	70,2%	1.895	1.711	90,3%	0	5,2	36,2	298,0	354,8	7,0
S4	09/09/19	1.730 ^(*)	6.395	3.075	48,1% ^(*)	2.089	1.886	90,3%	0	1,3	5,1	9,6 ^(*)	56,1 ^(*)	7,0
S5	09/01/20	4.656	11.192 ^(*)	8.188 ^(*)	73,2%	5.265	4.615	87,7%	0	0,3	16,1	302,0	121,0	7,1
S6	30/01/20	4.724	5.892	4.300	73,0%	5.308	4.573	86,2%	0	1,7	7,3	282,0	106,0	6,8
S7	11/11/20	2.890	5.257	3.728	70,9%	4.967	4.195	84,5%	0	0,2	5,4	297,0	120,0	7,0
PROMEDIO		4.455	5.699	3.807	71,4%	3.296	2.883	88,5%	0	2,4	22,7	294,8	175,5	6,9
DESV		771	419	414	1,3%	1.769	1.485	2,4%	0	2,0	19,4	9	120	0,1

^(*) Valores anómalos que se excluyen del promedio y desviación calculados; N.D.: No Determinado.

Tabla 18. Caracterización físico-química de las enzimas fitasas utilizadas en el lote de ensayos "S".

Ensayos	<i>DQO_T</i>	<i>ST</i>	<i>SV</i>	<i>SV</i>	<i>SST</i>	<i>%SST</i>	<i>SSV</i>	<i>%SSV</i>	<i>AGV</i>	<i>N-NH₄</i>	<i>P-PO₄</i>	<i>N_T</i>	<i>P_T</i>	<i>pH</i>
	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	%	mg·L ⁻¹	%	mg·L ⁻¹	%	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	-
S1	806.000	636.765	629.675	98,9%	15.900	2,5%	15.726	98,9%	2.034	610	1.004	N/A	N/A	4,3
S2	806.000	636.765	629.675	98,9%	15.900	2,5%	15.726	98,9%	2.225	610	1.004	N/A	N/A	4,2
S3	793.000	636.765	629.675	98,9%	15.900	2,5%	15.726	98,9%	2.225	728	1.199	N/A	1.090	4,3
S4	876.000	636.765	630.397	99,0%	15.900	2,5%	15.726	98,9%	2.133	777	1.125	N/A	N/A	4,3
S5	816.000	613.005	607.040	99,0%	14.885	2,4%	14.865	99,9%	2.053	697	1.146	N/A	1.219	4,6
S6	735.305	617.843	610.788	98,9%	16.485	2,7%	16.375	99,3%	2.336	746	1.124	N/A	1.288	4,5
S7	699.660	607.523	600.378	98,8%	19.910	3,3%	19.760	99,2%	2.707	931	1.078	N/A	1.103	4,3
PROMEDIO	790.281	626.490	619.661	98,9%	16.411	2,6%	16.272	99,2%	2.245	728	1.097	-	1.175	4,4
DESV	57.366	13.157	13.076	0,1%	1.614	0,3%	1.599	0,4%	230	110	73	-	-	0,1

N.D.: No Determinado.

En el lote de ensayos “S” se realizaron un total siete ensayos empleando enzima fitasa libre sobre fango secundario. Los cuatro primeros ensayos (S1 a S4) fueron ensayos preliminares en los que se fue variando los parámetros operacionales (temperatura, dosis de enzima, ajuste de pH) para conocer la respuesta del sistema a estos parámetros. En base a los resultados obtenidos tras cada ensayo, se fueron realizando ajustes con el objetivo de optimizar el proceso de liberación de P orgánico. Así mismo, fue necesario adaptar los parámetros de seguimiento de los ensayos, incluyéndose a partir del ensayo S3 la medición de pH y del P_T del fango secundario empleado. En la Figura 31 se detallan las variaciones realizadas en estos cuatro primeros ensayos.

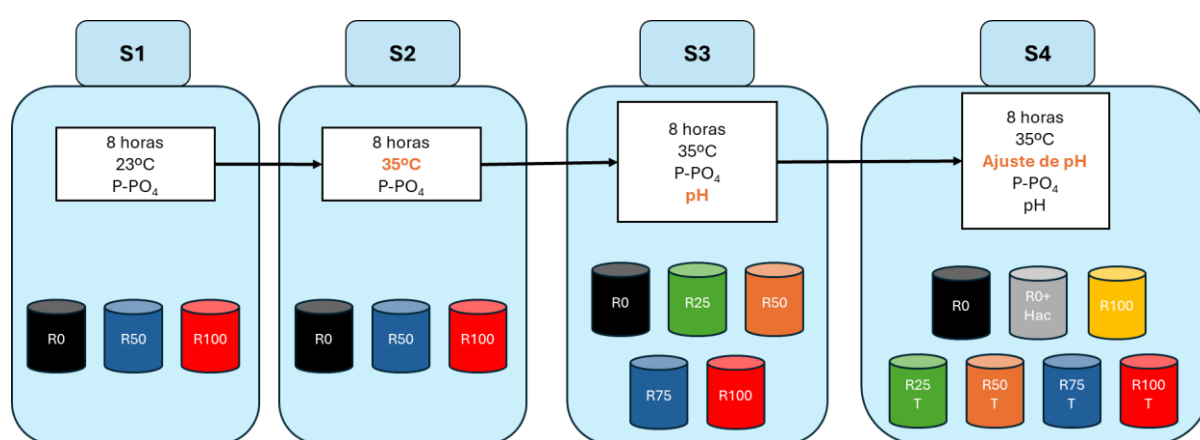


Figura 31. Parámetros operativos y de seguimiento en los ensayos S1, S2, S3 y S4.

El primer ensayo (**S1**) se llevó a cabo a 23°C, temperatura seleccionada debido a su proximidad con la temperatura media anual en la cámara de mezcla de la EDAR de Calahorra. En la Figura 32 se muestra la evolución de la acumulación de fosfato ($\Delta P-PO_4$) a lo largo del experimento, observándose decrementos para todos los reactores puestos en marcha (control (R0) y reactores con adición de enzima fitasa (R50 y R100)). Dichos decrementos oscilaron desde 35 mg P·L⁻¹ hasta 39 mg P·L⁻¹. Esta tendencia negativa indica una disminución de P-PO₄ en el medio, lo que podría estar asociado a procesos de precipitación química y/o adsorción sobre algún material presente en el sistema. Así mismo, en este ensayo no se observó ningún tipo de acción hidrolítica por parte de las enzimas fitasas sobre el fango secundario, ya que no se registró liberación de P en los reactores con adición de enzima.

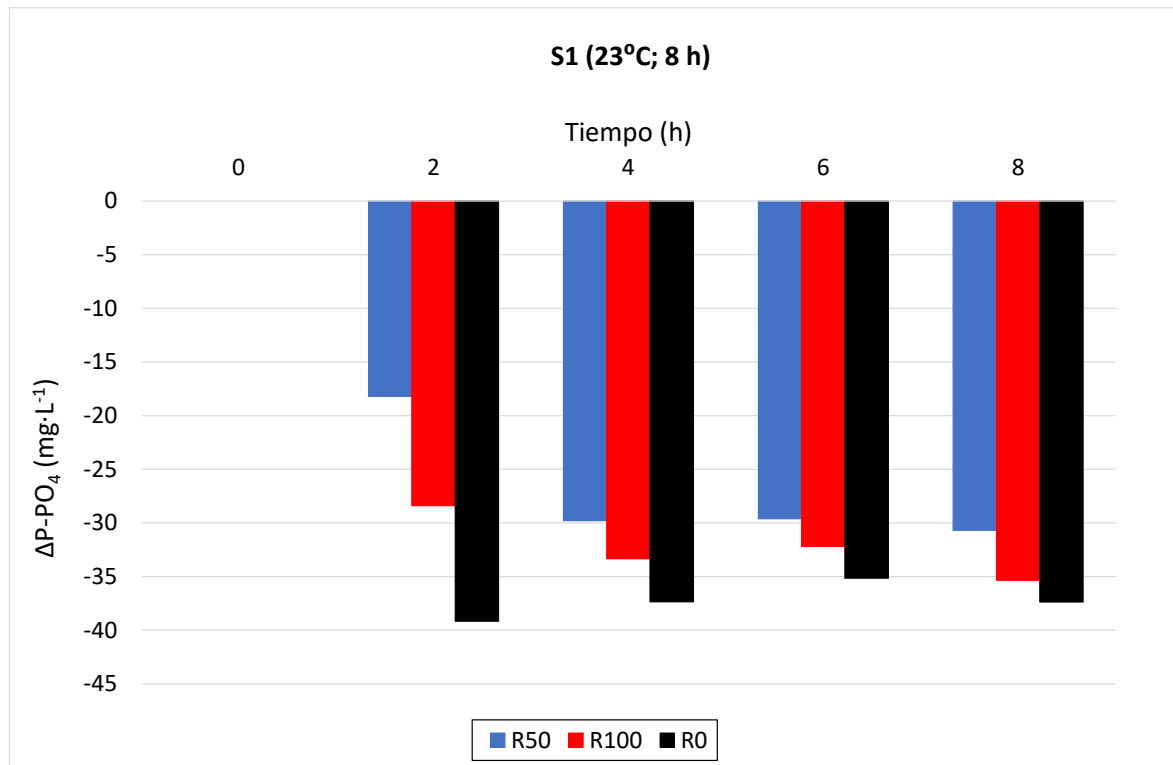


Figura 32. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "S1".

En base a los resultados obtenidos en el ensayo S1, se decidió aumentar la temperatura a 35°C en el siguiente ensayo (**S2**), alineándola con la temperatura a la que se eleva el fango durante el proceso de digestión en la EDAR de Calahorra. Este ajuste tuvo como objetivo evaluar si el aumento de temperatura favorecía la actividad enzimática de las fitasas sobre el fango secundario, optimizando así el proceso de liberación de P. Cabe destacar que la temperatura óptima de actividad de la enzima fitasa, según el fabricante, es de 50°C, por lo que el incremento a 35°C buscaba acercarse a un valor que pudiera potenciar su eficacia.

En el ensayo **S2** (Figura 33), se observaron decrementos de P-PO₄ en todos los reactores (R0, R50 y R100) durante las 2 primeras horas de ensayo.

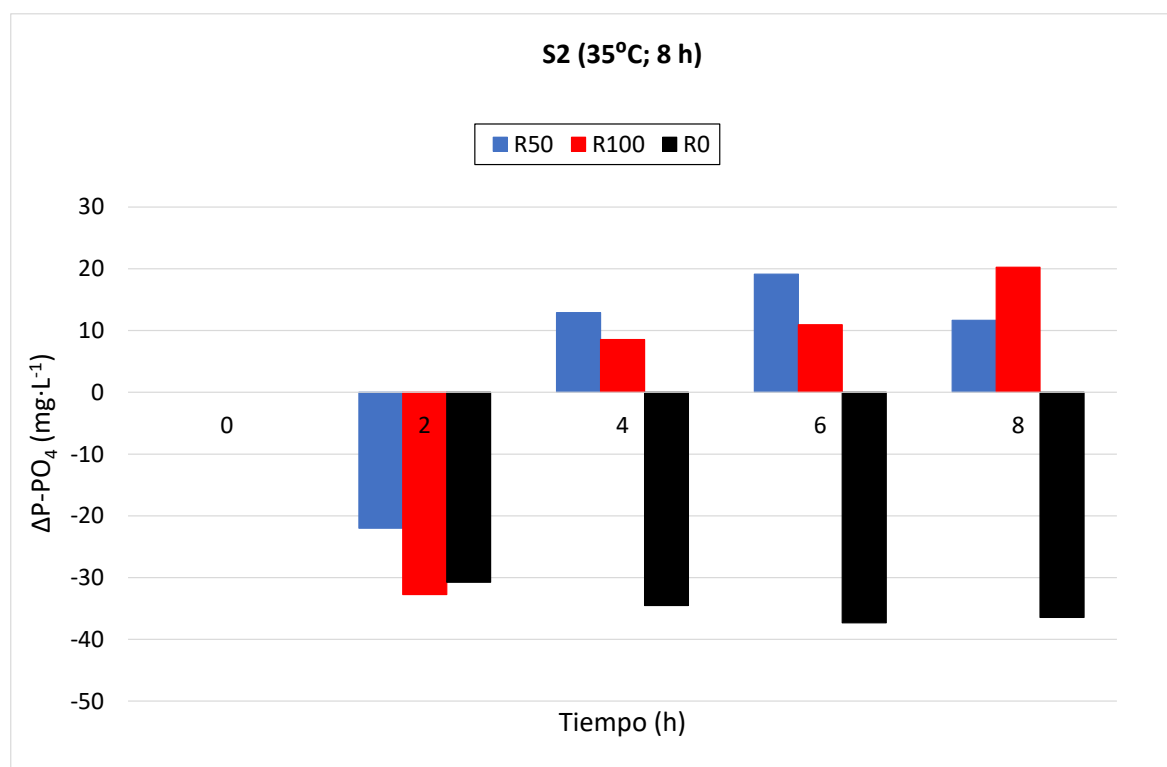


Figura 33. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "S2".

En el caso del reactor R0, se registró una tendencia negativa de la concentración acumulada de P-PO₄ durante todo el ensayo, alcanzándose pérdidas de P-PO₄ similares a las observadas en S1 (30 mg P·L⁻¹ – 37 mg P·L⁻¹). En cambio, en los reactores R50 y R100, a partir de las 4 horas de ensayo se registró una ligera liberación de P-PO₄ de 12,9 mg P·L⁻¹ y 8,5 mg P·L⁻¹, respectivamente, sugiriendo este hecho un efecto hidrolítico atribuible a la acción de las enzimas. Al cabo de 8 horas de ensayo, se observaron liberaciones de entre 12 mg P·L⁻¹ y 21 mg P·L⁻¹ en los reactores con adición enzimática, siendo mayor la cantidad de P-PO₄ liberada la del reactor con una dosis enzimática más elevada. El descenso inicial de la concentración de P-PO₄ en todos los reactores, así como los decrementos sostenidos en R0, podrían estar relacionados con cambios en el pH del sistema, ya que este parámetro influye directamente en la solubilidad y disponibilidad de P en forma P-PO₄. Un incremento del pH puede favorecer la precipitación del P como sales poco solubles (Darn et al., 2006), mientras que un descenso del pH del sistema podría propiciar la adsorción del P-PO₄ sobre partículas inorgánicas presentes en el medio (Yang et al., 2006). Este comportamiento observado podría atribuirse, por tanto, a fenómenos de precipitación y/o adsorción del P-PO₄. Para investigar más a

fondo estos posibles efectos, en los siguientes ensayos se consideró necesario medir el pH de cada reactor tras cada muestreo, con el fin de determinar si se producían variaciones significativas de este parámetro que pudieran haber favorecido la precipitación de especies de $P-PO_4$.

Los resultados obtenidos en el ensayo S2 **indicaron que el aumento de la temperatura de operación de 23°C a 35°C fomentaba la acción de las enzimas fitasas sobre el sustrato de estudio** (fango secundario). En función de estos resultados, se decidió mantener la temperatura de 35°C para los siguientes ensayos.

Así, en el ensayo **S3** (Figura 34) se mantuvieron las mismas condiciones operativas que en el ensayo S2 (35°C y 8 horas de duración experimental). El propósito de este ensayo fue doble: i) confirmar que se producían mayores liberaciones de $P-PO_4$ en los reactores con adición de enzima en comparación con el reactor de control (R0), como se observó en el ensayo S2; ii) realizar un barrido más amplio de dosis a añadir. Además, en este ensayo se comenzó a hacer seguimiento del pH de los reactores, para evaluar su variación durante el proceso y su posible influencia en las liberaciones de $P-PO_4$.

Los resultados indicaron nuevamente una pérdida de $P-PO_4$ en el reactor sin adición enzimática (R0), a lo largo de todo el experimento, detectándose este decremento en cada muestreo realizado cada dos horas. Después de 8 horas, el decremento de $P-PO_4$ observado en este reactor fue de 12,1 mg $P \cdot L^{-1}$.

Por su parte, la variación del pH (desde 7,5 hasta 6,6) no parece apoyar la hipótesis de que la pérdida de $P-PO_4$ en el medio se deba a procesos de precipitación. La precipitación de especies de $P-PO_4$ a pH neutro (alrededor de 7) no es común debido a que el $P-PO_4$, en su forma iónica, tiende a permanecer en solución en estos valores de pH.

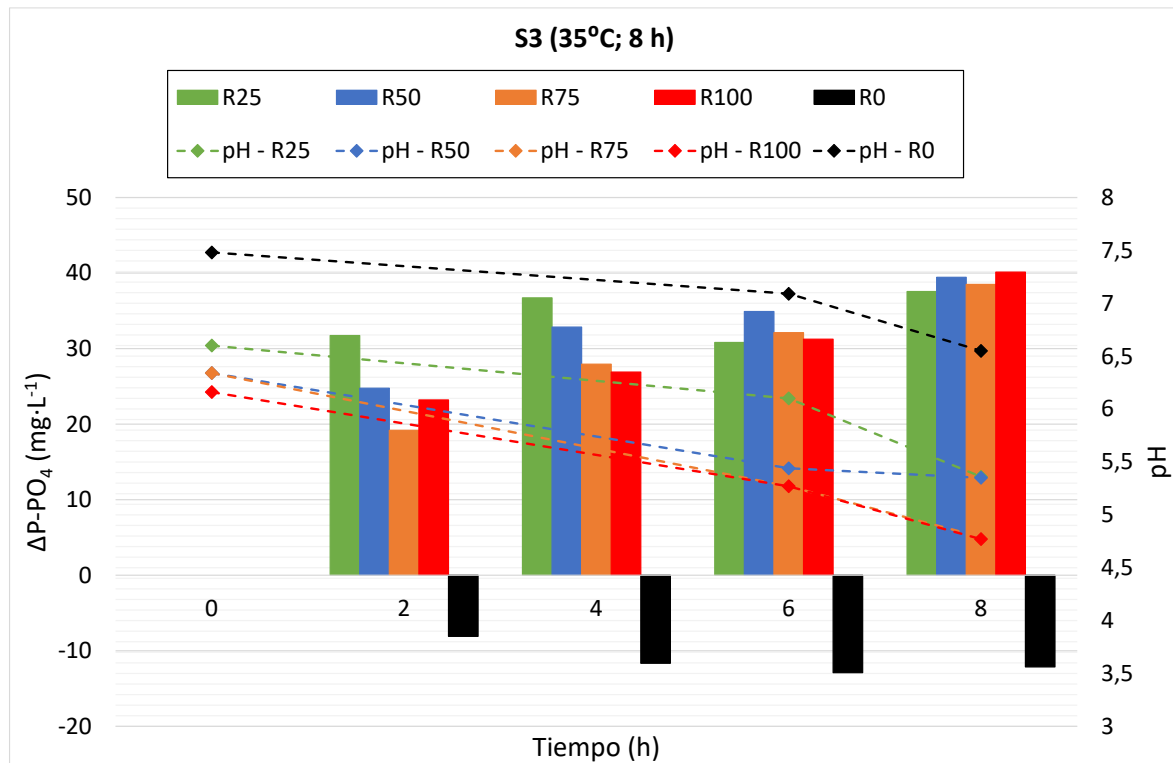


Figura 34. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "S3".

Para investigar posibles precipitaciones, se utilizó el programa Minteq, que permite evaluar aspectos como la solubilidad, especiación iónica, precipitación y disolución de fases sólidas de compuestos de P. Con este fin, se realizaron simulaciones en un rango de pH comprendido entre 7,5 y 4,0, siendo este último el pH al que se llegaba en los reactores con adición de enzima.

En cuanto a las especies de P susceptibles de formar precipitados, se analizaron los índices de saturación (en inglés: *Saturation Index, SI*), que permiten predecir el comportamiento de una fase sólida frente al equilibrio en solución, según los siguientes criterios:

- **SI > 0:** El sistema está sobresaturado con respecto a ese compuesto → **precipitación posible.**
- **SI ≈ 0:** En equilibrio → no hay tendencia clara.
- **SI < 0:** El sistema está subsaturado → el compuesto **no precipita.**

Los resultados obtenidos para las especies analizadas se presentan en la Tabla 19:

Tabla 19. Evolución del SI según el barrido de pH realizado con MINTEQ.

Mineral	SI pH 7,5	SI pH 7,0	SI pH 6,5	SI pH 5,5	SI pH 5,0	SI pH 4,5	SI pH 4,0
Brucite	-4,241	-5,155	-6,028	-7,854	-8,832	-9,825	-10,823
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am1)	3,067	2,019	0,745	-2,695	-4,665	-6,663	-8,67
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am2)	5,777	4,729	3,455	0,015	-1,955	-3,953	-5,96
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (beta)	5,646	4,597	3,323	-0,117	-2,086	-4,085	-6,091
Ca ₄ H(PO ₄) ₃ :3H ₂ O(s)	7,962	6,848	5,391	1,174	-1,288	-3,789	-6,3
CaHPO ₄ (s)	1,481	1,416	1,232	0,455	-0,037	-0,539	-1,044
CaHPO ₄ :2H ₂ O(s)	1,247	1,182	0,998	0,221	-0,272	-0,774	-1,278
Ferrihydrite	7,932	7,444	6,881	5,387	4,48	3,518	2,534
Ferrihydrite (aged)	8,442	7,954	7,391	5,897	4,99	4,028	3,044
Goethite	10,415	9,927	9,363	7,87	6,963	6,001	5,016
Hematite	23,274	22,298	21,171	18,184	16,37	14,446	12,477
Hydroxyapatite	16,016	13,984	11,621	5,518	2,071	-1,424	-4,933
Lepidocrocite	9,19	8,702	8,139	6,645	5,738	4,777	3,792
Lime	-19,329	-20,248	-21,153	-23,039	-24,024	-25,018	-26,016
Maghemite	14,736	13,761	12,634	9,647	7,832	5,909	3,94
Magnesioferrite	18,06	16,169	14,17	9,356	6,564	3,648	0,681
Mg(OH) ₂ (active)	-6,583	-7,497	-8,37	-10,196	-11,174	-12,167	-13,165
Mg ₃ (PO ₄) ₂ (s)	0,144	-0,894	-2,07	-5,33	-7,279	-9,273	-11,279
MgHPO ₄ :3H ₂ O(s)	0,502	0,44	0,288	-0,429	-0,914	-1,415	-1,919
Periclase	-8,513	-9,428	-10,301	-12,127	-13,105	-14,097	-15,095
Portlandite	-9,705	-10,623	-11,529	-13,415	-14,4	-15,394	-16,392
Strengite	7,13	7,495	7,653	7,268	6,853	6,384	5,893
Struvite	1,688	1,136	0,488	-1,228	-2,213	-3,214	-4,218

A partir de las simulaciones realizadas, utilizando las concentraciones medidas de iones presentes en el sistema junto con las condiciones de pH evaluadas (entre 7,5 y 4,0), se concluye que, bajo condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 5,0$), la mayoría de los compuestos de P evaluados se encuentran en subsaturación, lo que limita su precipitación espontánea. Solo algunas fases específicas, como la strengita, se mantienen sobresaturadas en todo el rango, aunque su formación depende de condiciones adicionales no garantizadas (disponibilidad de Fe^{3+}). La estruvita presenta índices de sobresaturación positivos en el rango de pH 7,5 a 6,5, con valores de SI de 1,688 a 0,488 (valores moderados). Esto indica que, en este intervalo, existe un potencial termodinámico favorable para su precipitación. A partir de pH 5,5, el SI se vuelve negativo, lo que indica que la solución está subsaturada respecto a la estruvita y, por tanto, su precipitación no es termodinámicamente favorable. No obstante, incluso en el rango de pH en el que sí se observa sobresaturación ($\text{pH} \geq 6,5$), la concentración de Mg^{2+} disponible ($120 \text{ mg Mg} \cdot \text{L}^{-1}$) es insuficiente para precipitar toda la fracción de P presente como estruvita. Considerando las concentraciones de N-NH_4 y P-PO_4 ($600 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ y $318 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente), la concentración de Mg actúa como limitante, por lo tanto, si hay precipitación de estruvita esta será parcial.

Por su parte, las fases como ferrihidrita, goetita, hematites, lepidocrocita y maghemita presentan altos SI en todo el rango de pH, lo que indica una alta tendencia a precipitar o estar ya presentes como fases sólidas. Su presencia influye en la retención de P, principalmente a través de mecanismos de adsorción o coprecipitación.

Por lo tanto, esta desaparición de P-PO_4 en el medio podría achacarse principalmente a otros fenómenos como **procesos de adsorción de la especie P-PO_4 sobre determinados materiales presentes en el fango secundario**, como óxidos e hidróxidos metálicos (Babatunde & Zhao, 2007; de-Bashan & Bashan, 2004; Gon Kim et al., 2002). No obstante, debe considerarse también la posible formación de precipitados inorgánicos en función del pH del medio. En particular, cuando el pH es superior a 5,5–6,0, algunos minerales alcanzaron SI positivos (ver Tabla 19), lo que indica condiciones favorables para la precipitación. En el ensayo R0, donde se registraron valores de pH relativamente altos, es posible que se hayan formado y mantenido precipitados estables, mientras que en otros ensayos con pH más bajo podrían haberse disuelto. Por

tanto, tanto la adsorción como la precipitación y disolución dependiente del pH deben considerarse como mecanismos concurrentes en la desaparición del fosfato inorgánico del medio.

Así, para S3, a diferencia de lo observado en R0, en los reactores con dosis enzimática, se observó un aumento progresivo de la acumulación de $P-PO_4$ en el medio. Esto sugiere una liberación de este compuesto en estos reactores debido a la acción hidrolítica de la enzima añadida. Tras 8 horas, las cantidades finales de $P-PO_4$ liberado fueron de 19,9 mg $P \cdot L^{-1}$ en R25, 24,7 mg $P \cdot L^{-1}$ en R50, 24,9 mg $P \cdot L^{-1}$ en R75 y 27,3 mg $P \cdot L^{-1}$ en R100. Se observa que la menor liberación de fosfato ocurrió en el reactor con la dosis más baja de enzima (R25), mientras que la mayor liberación se presentó en el reactor con la dosis más alta (R100). Por otro lado, las liberaciones en R50 y R75 fueron similares. En cuanto a la evolución del pH en los reactores con adición de enzima, se observó un menor valor inicial cuanto mayor era la dosis añadida, debido al pH ácido de la enzima, y un descenso de este parámetro con el transcurso del tiempo hasta valores que oscilaron entre 4,8 y 5,4. **Esta disminución progresiva del pH podría estar asociada con la potenciación de los procesos de hidrólisis por parte de las enzimas fitasas, lo que, en determinadas condiciones, podría favorecer la actividad de las bacterias acidogénicas y provocar una acumulación de AGV en el medio.**

Con el objetivo de analizar el efecto de la variación del pH en el estudio enzimático, en el ensayo **S4** (Figura 35) se decidió tamponar el medio de los reactores enzimáticos mediante la adición de un volumen determinado de tampón bicarbonato. El propósito de esta modificación experimental fue comprobar si el control del pH podía favorecer la hidrólisis del fosfato orgánico llevada a cabo por la enzima fitasa. Este ensayo se consideró necesario dado que, en los ensayos enzimáticos previos, el pH del sistema se encontraba fuera del intervalo óptimo de actuación de la fitasa (pH 5,5–6,6), lo que podría haber limitado significativamente su eficacia.

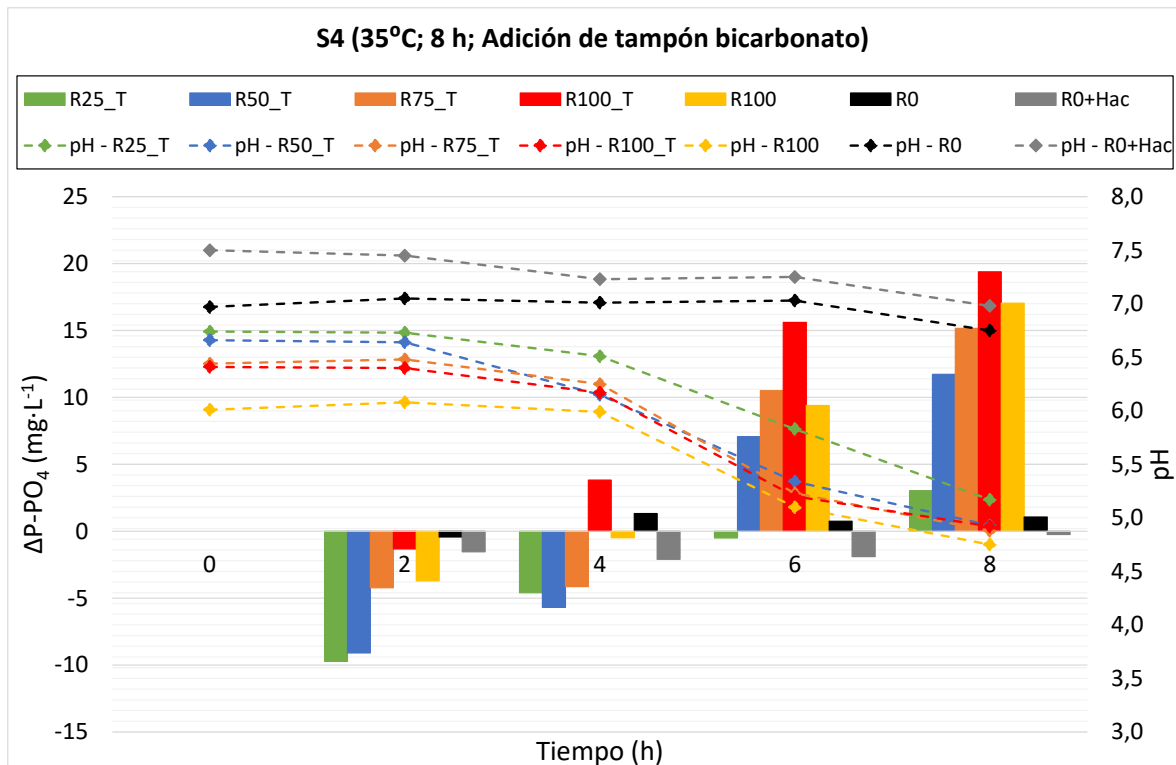


Figura 35. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "S4".

Así mismo, se aprovechó este ensayo para descartar la posible liberación de fosfato, asociada a la degradación del Poly-P que pudiera estar presente en las bacterias PAO del fango secundario, debido a la introducción de AGV con la dosificación de enzima. Para ello se incorporó un reactor denominado R0+Hac, al que se añadió un volumen específico de ácido acético tamponado. De este modo, en el ensayo S4 se pusieron en marcha un total de 7 reactores:

- R0 y R0+Hac: En estos reactores no se tamponó el medio de reacción debido a que no se espera un descenso de pH relevante.
- R25_T, R75_T, R100_T: Adición de un determinado volumen de bicarbonato a los reactores para tamponar el medio.
- R100: Sin adición de tampón al medio de reacción para su comparativa con R100_T.

Analizando los resultados de este ensayo, se pudo observar que en el reactor R0, a diferencia de lo observado en ensayos previos, no se registraron disminuciones en la concentración de $P-PO_4$,

observándose pequeñas liberaciones a partir de las 4 horas de ensayo. No obstante, a las 2 horas se detectó un leve decremento de $P-PO_4$, con una reducción de $0,4 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, que no se mantuvo en el tiempo. En el caso del reactor $R0+Hac$, se observó una tendencia similar a la del reactor $R0$, sin liberación de $P-PO_4$ al medio, incluso produciéndose un descenso de este parámetro, descartándose por tanto la presencia de Poly-P almacenado intracelularmente. En el caso de los reactores con adición enzimática, se obtuvieron liberaciones de $P-PO_4$ de $8,4 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en $R25\_T$, $10 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en $R50\_T$, $15,1 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en $R75\_T$ y $19,3 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en $R100\_T$. En el reactor $R100$ (sin adición de tampón bicarbonato), se observó una acumulación de $17 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, muy similar a la del reactor $R100\_T$ (con el medio tamponado).

Analizando la evolución del pH, se observa que los reactores $R0$ y $R0+HAC$ siguieron una tendencia similar y estable durante las seis primeras horas de ensayo con un leve descenso entre las 6 y 8 horas hasta alcanzar valores finales de 6,8 y 7,5, respectivamente. Este ligero descenso de pH, observado en ambos reactores, puede atribuirse a la hidrólisis natural del fango, que libera protones al medio.

En cuanto a los reactores con adición enzimática, a pesar de la adición del tampón de bicarbonato el pH de estos reactores volvió a descender al cabo de las 8 horas de experimento a valores comprendidos entre (4,8 y 5,2). Esto sugiere que la capacidad buffer del sistema no fue suficiente para neutralizar completamente la acidez generada, posiblemente por una producción de AGV que superó la capacidad del tampón. La comparación con respecto a lo observado en $S3$ evidencia que, aunque la adición de tampón en $S4$ tuvo un efecto moderador inicial, no logró evitar la caída del pH en el transcurso del experimento, lo que refuerza la idea de que la actividad enzimática potencia la acidogénesis. Sin embargo, en $S4$ se logró una leve atenuación respecto a $S3$, con valores finales de pH ligeramente más altos en el caso de $R25\_T$, $R75\_T$ y de $R100\_T$, lo que indica un efecto parcial del tampón. En cuanto a la comparativa entre $R100\_T$ y $R100$, se registraron valores de pH muy similares, siendo ligeramente menor en el caso de $R100$ (sin tampón), con un valor final de 4,8 frente a 4,9 en $R100\_T$. Por otro lado, la liberación acumulada de $P-PO_4$ fue algo menor en $R100$ ($17 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$) que en $R100\_T$ ($19,4 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$).

Cabe destacar que, aunque inicialmente se esperaba que la adición de tampón bicarbonato al medio favoreciera la liberación de P-PO_4 al proporcionar un entorno con pH más controlado, el efecto observado fue limitado. Este resultado puede explicarse por dos factores. En primer lugar, el uso de tampón bicarbonato tiende a estabilizar el pH en valores relativamente altos, lo cual, si bien evita descensos bruscos del pH, también puede alejar el sistema del intervalo óptimo de actuación de la fitasa (pH 5,5–6,6), reduciendo así su eficacia. En segundo lugar, un pH más alto puede favorecer la precipitación de fosfato con ciertos cationes presentes en el medio (como Ca^{2+} o Fe^{3+}), lo que limitaría aún más la concentración de P-PO_4 libre en solución. Por tanto, el efecto limitado observado no sólo se debe a una posible pérdida de actividad enzimática por condiciones de pH subóptimas, sino también a procesos de precipitación inorgánica favorecidos por el entorno alcalino mantenido por el tampón.

En la Tabla 20 se recogen para los ensayos **S3** y **S4** las liberaciones de P-PO_4 obtenidas y las eficacias calculadas para cada dosis de enzima al final del tiempo de experimentación siguiendo la metodología de cálculo descrita en el apartado 3.7.2. Las liberaciones netas de fosfato y los rendimientos obtenidos en los ensayos S3 y S4 para los reactores R25, R50 y R75 muestran una variabilidad interexperimental significativa. Una posible explicación de esta variabilidad radica en la diferencia en la concentración de P_T del fango secundario utilizado, tal y como puede observarse en la Tabla 16. Este es 6 veces mayor en el ensayo S3 que en el ensayo S4, lo que tiene un impacto directo en los resultados de liberación de P-PO_4 , ya que está directamente relacionado con la cantidad de $\text{P}_{\text{org disponible}}$ en el medio. Así mismo, el %P org hidrolizado, parámetro indicativo del grado de hidrólisis del fango secundario, presenta valores similares en ambos ensayos (9% y 10% para S3 y S4, respectivamente).

En el ensayo **S3**, las **liberaciones netas de P-PO_4** obtenidas fueron bastante similares entre todas las dosis ensayadas, situándose en torno a unos 37 mg $\text{P}\cdot\text{L}^{-1}$. Del mismo modo, los **porcentajes de eficacia** apenas muestran variaciones relevantes variando alrededor del 12%. Estos resultados evidencian que el incremento en la dosis de enzima no se traduce en una mejora sustancial en la liberación de P, lo que cuestiona la viabilidad de aplicar dosis elevadas desde el punto de vista económico.

Tabla 20. Ensayos correspondientes al lote "S" realizados a temperatura de operación 35°C y tiempo experimental 8 horas (S3 y S4).

Ensayos	Reactor	P _T	P-PO ₄	P _{org} disponible	P _{org} hidrolizado	ΔP-PO ₄ ENZIMA	Eficacia
		mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
S3	R25	354,8	36,2	319	10	37,6	11,8
	R50					39,5	12,4
	R75					38,5	12,1
	R100					40,1	12,6
S4	R25_T	56,1	5,1	50,9	9	2,0	3,9
	R50_T					10,7	21,0
	R75_T					14,1	27,7
	R100_T					18,3	36,0
	R100					16,0	31,4

En el ensayo **S4**, las **liberaciones netas de P-PO₄** aumentaron ligeramente con la dosis de enzima, pasando de 10,7 mg P·L⁻¹ en R50_T a 18,3 mg P·L⁻¹ en R100_T, con un resultado ligeramente inferior (16,0 mg P·L⁻¹) en el reactor R100 sin tampón. El valor correspondiente a R25_T se encuentra muy por debajo del resto de valores. En cuanto a los **porcentajes de eficacia**, se observa un patrón similar variando desde un 21,0 % en R50_T hasta un 36,0 % en R100_T, y mostrando R25_T un valor muy alejado (3,9 %) al obtenido con el resto de dosis, resultado de la baja liberación neta de P-PO₄ observada para este reactor. Aunque se aprecia una mejora progresiva en la eficacia con el aumento de la dosis, las diferencias entre R75_T y R100_T no son lo suficientemente significativas como para justificar el mayor coste que implicaría el uso de la dosis más alta. Este hecho, observado también en el ensayo S3, condujo a **descartar la dosis R100, al lograrse prácticamente el mismo grado de liberación que con la dosis R75**. Además, la dosis aplicada en R100 (100 g enzima·kg⁻¹ fango) de partida, representaría un consumo excesivo de enzima que encarecía significativamente el proceso.

Dada la baja liberación de P-PO₄ observada en los experimentos anteriores, especialmente en el ensayo S3 que mostraba un mayor P_{org} disponible, se planificaron tres nuevos ensayos incrementando el tiempo de operación con el objetivo de comprobar si un mayor tiempo de reacción

favorecía la liberación de P. En la Figura 36 se detallan las variaciones realizadas en estos tres ensayos. La nueva duración de los ensayos se fijó en 22 horas, coincidiendo con el tiempo máximo que el fango puede permanecer en la cámara de mezcla de la EDAR de Calahorra, lo que permitiría aplicar las enzimas al proceso industrial sin necesidad de modificar la instalación. En esta nueva etapa experimental se evaluaron las mismas dosis de enzima que en los ensayos anteriores, exceptuando la R100, que fue descartada por su elevado consumo y escasa mejora en el rendimiento.

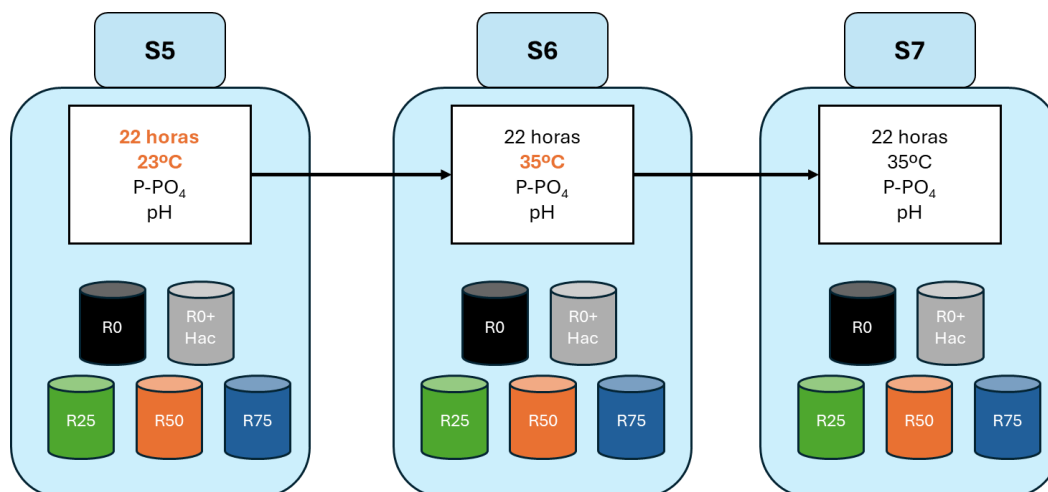


Figura 36. Parámetros operativos y de seguimiento en los ensayos S5, S6 y S7.

En el **ensayo S5**, se realizó a una temperatura de 23°C, esta vez combinada con una duración experimental extendida a 22 horas, para comprobar si el aumento del tiempo de reacción permitía obtener liberaciones de fosfato a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos (Figura 37) muestran que tras alcanzarse las 22 horas, para los reactores R0 y R0+Hac prácticamente no se observó liberación acumulada de P-PO₄. En los reactores con enzima, después de 22 horas se registraron liberaciones de fosfato de 17,4 mg P·L⁻¹ en R25, 23,2 mg P·L⁻¹ en R50 y 19,3. mg P·L⁻¹ en R75. Al compararse los ensayos S5 (22 horas; 23°C) y S1 (8 horas; 23°C), se observa que el incremento de 8 a 22 horas tiene un efecto positivo en la liberación acumulada de P-PO₄, obteniéndose valores positivos para los reactores con adición de enzima, frente a los decrementos de P-PO₄ registrados tras las 8 horas de experimentación del ensayo S1. En el caso del reactor R0, tal y como se ha mencionado previamente, no se observó prácticamente liberación de P-PO₄, lo que refuerza la idea

de que la liberación neta atribuida a la acción de la fitasa mejora sustancialmente respecto a lo observado en S1, en el que todos los reactores presentaron pérdidas de $P-PO_4$.

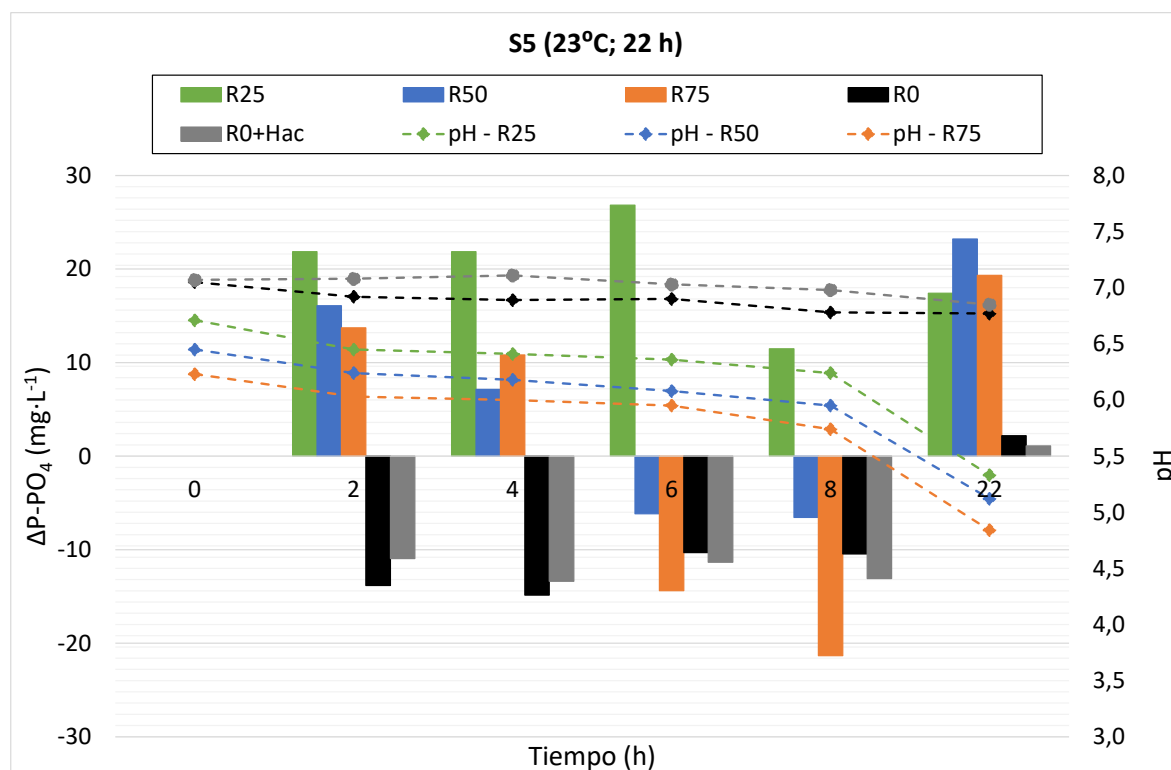


Figura 37. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "S5".

Por su parte, si se comparan las liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ de S5 con las obtenidas en los ensayos S3 y S4 (ver Figura 34 y Figura 35), se observa que, aunque la prolongación del tiempo experimental de 8 a 22 horas a 23 °C mejora las liberaciones acumuladas de $P-PO_4$, dicha mejora no resulta significativa cuando se compara con las liberaciones alcanzadas tras 8 horas de experimentación trabajando a 35 °C. En base a estos resultados **se decidió aumentar la temperatura de 23 a 35°C, manteniendo la duración del experimento en 22 horas y las dosis de enzima ensayadas.**

En el **ensayo S6** (Figura 38) y en el **ensayo S7** (Figura 39) se observaron similares liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ en los reactores sin adición de enzima (R0 y R0-HAc) tras 22 horas de experimentación a 35°C (i.e., 19-22 mg $P \cdot L^{-1}$ en S6 y 26-28 mg $P \cdot L^{-1}$ en S7).

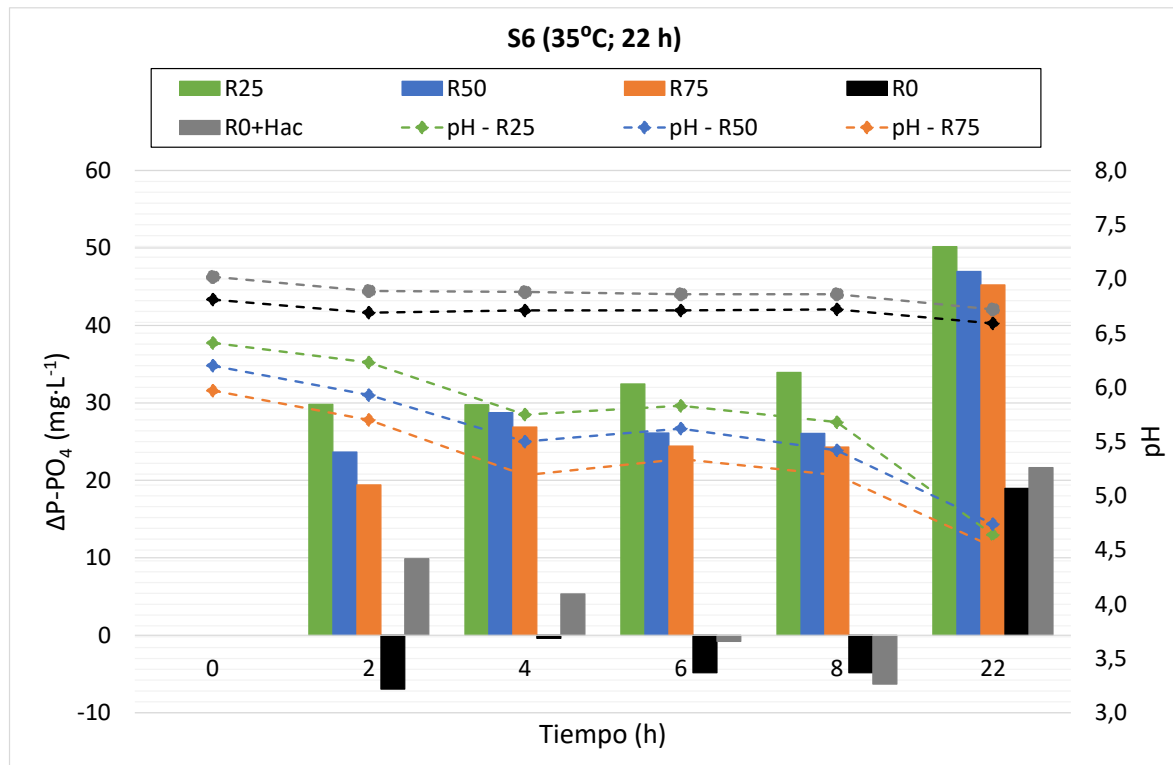


Figura 38. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "S6".

En los reactores con adición de enzima, en ambos ensayos se observaron acumulaciones de P-PO₄ a las 22 horas bastante similares en los tres reactores, siendo del orden de 45-50 mg P·L⁻¹ para S6 y de 64-70 mg P·L⁻¹ para S7. En ambos casos, destaca una mayor acumulación de fosfato en el reactor con la menor adición enzimática (R25). Además, la tendencia de la liberación acumulativa en los tiempos intermedios (2, 4 y 6 horas) fue también similar en los dos ensayos, siendo siempre ligeramente mayor en el caso de R25, lo que refuerza este comportamiento observado al final del ensayo.

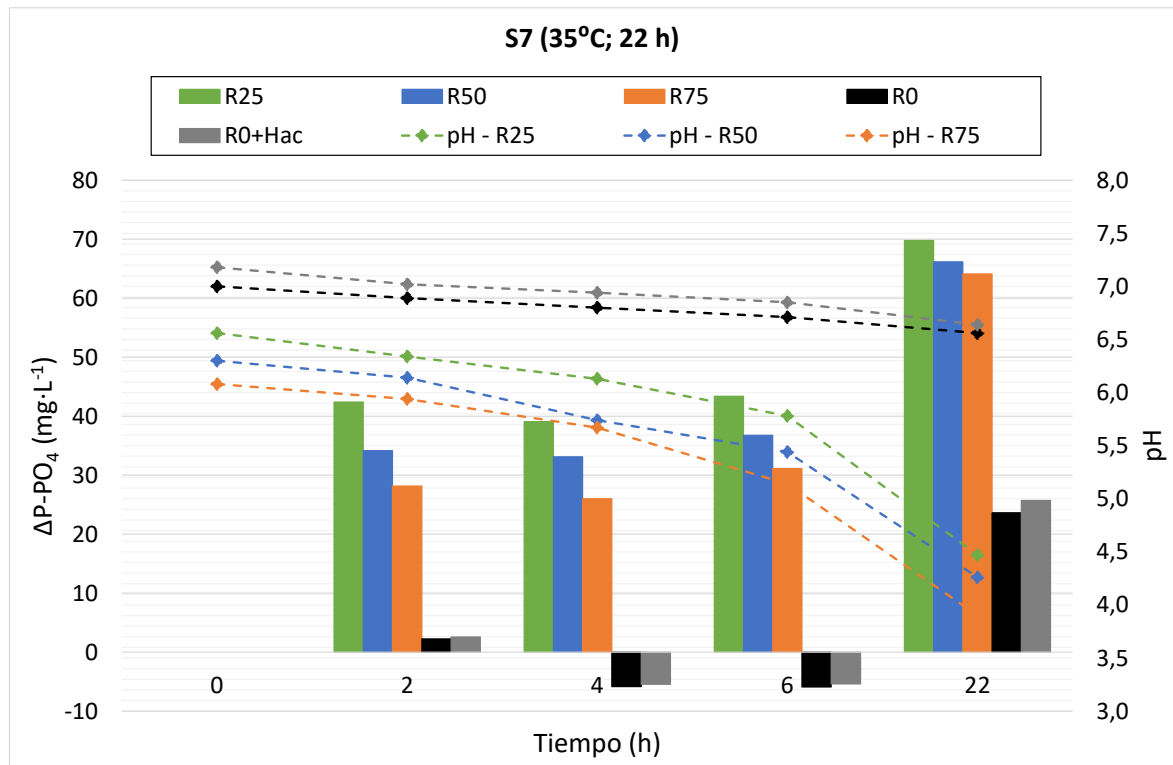


Figura 39. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "S7".

La **evolución del pH en los ensayos S6 y S7** siguió un comportamiento similar al observado en **S3 y S4**. En los reactores sin enzima, el pH se mantuvo prácticamente constante, con un leve descenso final atribuible a la actividad fermentativa de las bacterias acidogénicas presentes en el fango. En los reactores con enzima, el pH disminuyó de forma más pronunciada, especialmente a mayores dosis, debido a la intensificación de la actividad acidogénica favorecida por la adición de fitasas.

Al igual que en los ensayos anteriores, se presentan en la Tabla 21 los principales parámetros que permiten evaluar la eficacia de la liberación de P por acción de las enzimas fitasa en los nuevos ensayos.

Tabla 21. Ensayos correspondientes al lote "S" realizados a temperatura de operación 23°C (S5), 35°C (S6 y S7) y tiempo experimental 22 horas, respectivamente.

Ensayos	Reactor	P _T	P-PO ₄	P _{org} disponible	P _{org} hidrolizado	ΔP-PO ₄ ENZIMA	Eficacia
		mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
S5	R25	121	16,1	105	13	15,2	14,5
	R50					21,0	20,1
	R75					17,2	16,3
S6	R25	106	7,3	99	7	31,2	31,6
	R50					28,0	28,4
	R75					26,3	26,6
S7	R25	120	5,4	115	4	47,0	40,9
	R50					44,2	38,6
	R75					43,0	37,5

Como puede observarse en la Tabla 21, los fangos secundarios empleados en los ensayos S5, S6 y S7 presentan concentraciones de P_T similares, comprendidas entre 106 mg P·L⁻¹ y 121 mg P·L⁻¹. Del mismo modo, los valores de P_{org} disponible se sitúan en un orden de magnitud similar, entre 99 mg P·L⁻¹ y 115 mg P·L⁻¹. En cuanto al grado de hidrólisis del fango, expresado como P_{org} hidrolizado, se aprecian diferencias más marcadas, con porcentajes que varían entre el 4% y el 13%, destacando una mayor hidrólisis del P inicial en el caso del ensayo S5.

En el ensayo S5, realizado a 23°C, se observan liberaciones netas de P-PO₄, comprendidas entre 15,2 mg P·L⁻¹ y 21,0 mg P·L⁻¹, similares entre sí para las tres dosis de enzima ensayadas, siendo en este caso ligeramente mayor la correspondiente al reactor R50. La eficacia, con valores entre 14,5% y 20,1%, muestra un comportamiento análogo. Así mismo, si comparamos estos valores con los

obtenidos en los ensayos S6 y S7, realizados a 35°C, se observa **que elevar la temperatura del proceso de 23°C a 35°C promueve la acción de las enzimas fitasa, incrementando su efecto hidrolítico sobre el fango secundario**

En el ensayo S6, la dosis más baja (R25) mostró la mayor liberación neta de P-PO₄ (31,2 mg P·L⁻¹) y el mayor porcentaje de eficacia (31,6%), mientras que al aumentar la dosis a R50 y R75 no se observaron mejoras significativas (28,0 mg P·L⁻¹ y 28,4% en R50; 26,3 mg P·L⁻¹ y 26,6% en R75), lo que indica que dosis superiores no compensan el mayor coste asociado.

En el ensayo S7, la liberación neta de P-PO₄ fue ligeramente superior en el reactor con menor dosis enzimática (R25), alcanzando 47,0 mg P·L⁻¹. Por su parte, los porcentajes de eficacia siguieron la misma tendencia, siendo más elevados cuanto menor fue la dosis aplicada. **Estos resultados confirman que no se obtiene un incremento sustancial del rendimiento al aumentar la dosis, lo que refuerza la conveniencia de utilizar dosis bajas.**

Por último, si se comparan los resultados obtenidos en los ensayos S6 y S7 (22 horas) con los de S3 y S4 (8 horas) (ver Tabla 20 y Tabla 21), se observa que una mayor duración experimental produce una mayor liberación de P-PO₄ y un aumento en la eficacia del proceso. Esta tendencia sugiere que **el tiempo de contacto entre las enzimas y el fango es un factor determinante para maximizar la liberación de P**, lo que refuerza la decisión de ampliar la duración de los ensayos a 22 horas, unido a su compatibilidad con mantener estas condiciones en el proceso industrial.

Como se ha mostrado en los resultados expuestos hasta el momento, existe cierta variabilidad en los valores obtenidos para los parámetros objetivo (variables respuesta) del proceso: liberación neta de P-PO₄ ($\Delta P-PO_4$ ENZIMA) y eficacia. Con el objetivo de poder dilucidar de forma más clara la influencia de los parámetros ambientales (características del fango, es decir P_T, P-PO₄, P_{org} disponible y P_{org} hidrolizado) y los parámetros operacionales del proceso (tiempo de operación, temperatura y dosis de enzima aplicada) se ha realizado un estudio estadístico a partir de la información recopilada en los ensayos S3, S4, S5, S6 y S7. Del estudio se han excluido los experimentos realizados en medio tamponado del ensayo S4.

La Tabla 22 muestra las correlaciones y los p-valores para las variables de estudio analizadas.

Tabla 22. Correlaciones entre variables implicadas en el estudio enzimático con fango secundario ($\alpha = 0,05$).

	P_T	$P-PO_4$	P_{org} disponible	P_{org} hidrolizado	$\Delta P-PO_4$ ENZIMA	Eficacia	Tiempo	T^a	Dosis
P_T									
<i>p-value</i>									
$P-PO_4$	0,96								
<i>p-value</i>	0,0000								
P_{org} disponible	1,00	0,95							
<i>p-value</i>	0,0000	0,0000							
P_{org} hidrolizado									
<i>p-value</i>									
$\Delta P-PO_4$ ENZIMA				-0,67					
<i>p-value</i>				0,0093					
Eficacia	-0,71	-0,87	-0,69	-0,84					
<i>p-value</i>	0,0043	0,0001	0,0067	0,0002					
Tiempo	-0,77	-0,76	-0,76			0,56			
<i>p-value</i>	0,0013	0,0016	0,0015			0,0380			
T^a				-0,73	0,68				
<i>p-value</i>				0,0032	0,0076				
Dosis									
<i>p-value</i>									

Como se puede observar existe una correlación estadísticamente significativa entre el P_T y el P_{org} disponible, lo que indica que un mayor P_T implica un mayor P_{org} disponible y, por tanto, un mayor potencial de acción de la enzima. Sin embargo, la eficacia muestra una correlación negativa con el P_T , el P_{org} disponible y el $P-PO_4$ inicialmente presente en el fango. Esta correlación negativa con el P_T y el P_{org} disponible sugiere que un aumento en estos parámetros se traduce en una menor eficacia. Es decir, aunque haya más P disponible para ser hidrolizado por parte de la enzima esto no se refleja en un aumento del $P-PO_4$ liberado por la enzima ($\Delta P-PO_4$ ENZIMA), lo que hace disminuir la eficacia global de

proceso. Es decir, una mayor presencia de P potencialmente hidrolizable no garantiza una mayor acción de la enzima. Este comportamiento podría explicarse por la naturaleza del P orgánico presente en el fango, que posiblemente no este asociado a ácido fítico (compuesto sobre el que actúa la enzima), sino a otras formas de P orgánico, como las asociadas a la estructura celular de las bacterias del fango secundario, sobre las que el enzima fitasa no tiene efecto. Finalmente, cabe destacar que la dosis no correlaciona significativamente con ninguna de las variables analizadas. Así mismo, la información aportada por las variables tiempo y temperatura corrobora que un aumento de la temperatura favorece la liberación de fosfato por parte de la enzima y que prolongar el tiempo de contacto entre enzima y sustrato mejora la eficacia del proceso.

Por otra parte, el análisis de la varianza (ANOVA) realizado indica que el P_T y el $P_{org\ disponible}$ tienen un efecto significativo sobre las variables $\Delta P-PO_4\ ENZIMA$ y eficacia ($p-value < 0,05$). Esto sugiere que diferentes cargas de P_T al sistema pueden generar liberaciones y eficacias distintas. Sin embargo, la dosis no tiene un efecto significativo ($p-value > 0,05$) sobre ninguna de las variables respuesta ($\Delta P-PO_4\ ENZIMA$ y eficacia).

4.1.5. LOTE DE ENSAYOS “M”: ENZIMAS FITASAS APLICADAS SOBRE FANGO MEZCLA

Una vez analizado el funcionamiento de la enzima con fango secundario y habiendo comprobado que el aumento de la temperatura y del tiempo de operación favorecían la actividad enzimática, se decidió proseguir con el estudio trabajando con fango mezcla dado que este fango ya es sometido a un calentamiento en la EDAR antes de ser introducido en la digestión anaerobia. Así mismo, como se ha comentado anteriormente, el fango mezcla está constituido por la mezcla del fango primario y secundario por lo que este sustrato contiene todo el P orgánico susceptible de ser hidrolizado, produciéndose esta mezcla en un tanque (cámara de mezcla) ya existente en la EDAR y que permitiría la adición y homogenización de las enzimas aportadas.

Por tanto, en el *Lote de Ensayos “M”* los experimentos se llevaron a cabo a 35°C, manteniendo el tiempo máximo de los ensayos en el límite máximo de TRH de la cámara de mezcla de la EDAR de Calahorra (22 horas). En cuanto a las dosis enzimáticas que se probaron, se realizó un barrido más extenso, introduciendo dosis nuevas que fueron desde un 0,5% de la dosis óptima (100 g enzima·kg⁻¹ fango) indicada por el proveedor, hasta un 69 % (ver Tabla 7 y Tabla 9). Cabe destacar que no se incluyeron reactores del tipo R0+Hac en todos los ensayos. Esto se debió a que, en los primeros ensayos del presente lote en los que sí se implementaron, no se observó una mayor liberación de P-PO₄ en comparación con los reactores R0. Este resultado sugiere que la adición de una elevada concentración de ácido acético no induce la liberación del Poly-P acumulado en las bacterias PAO. Por este motivo, se consideró innecesario repetir esta condición en las siguientes fases del estudio.

En las tablas Tabla 23 y Tabla 24 se detallan los resultados obtenidos de las analíticas realizadas. En relación con el sustrato **fango mezcla**, la concentración de ST (39.805 mg ST·L⁻¹) y SV (31.080 mg SV·L⁻¹) junto con un porcentaje de volátiles del 77,9% evidencian que una fracción considerable del total de sólidos es orgánica y, por tanto, potencialmente biodegradable. Así mismo, se obtienen valores elevados de SST y SSV (37.076 mg SST·L⁻¹ y 29.313 mg SSV·L⁻¹, respectivamente) y del %SSV (78,9%) atribuible a la gran carga de biomasa presente en esta corriente, tras haber sometido los fangos, primario y secundario, a un proceso de espesamiento previo; así como a otros compuestos orgánicos que vienen con las aguas residuales urbanas y van al fango primario. También

se observa un valor elevado de DQO ($61.867 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), relacionado con la gran cantidad de materia orgánica particulada presente en este sustrato.

Respecto a las concentraciones de nutrientes, la concentración de P_T muestra un valor experimental promedio muy alto ($775 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que está directamente relacionado con la elevada concentración de SST en esta corriente. Además, se registra una alta concentración de fosfato ($237 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$), atribuida a la liberación del Poly-P almacenado intracelularmente en las bacterias PAO. Esta liberación se produce rápidamente, en presencia de una elevada concentración de AGV ($1.819 \text{ mg CH}_3\text{COOH}\cdot\text{L}^{-1}$) en el fango mezcla, como es el caso. Cabe resaltar también la significativa generación de AGV por fermentación de la materia orgánica biodegradable. El N total promedio registra un valor elevado ($1.817 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$), procedente de materia orgánica y biomasa. Por su parte, el valor promedio de la concentración de N-NH_4 ($199 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$) en el fango mezcla se considera normal y coherente con los valores típicos en fangos mixtos espesados, debido a la liberación de N durante la degradación orgánica.

En cuanto al valor de pH (5,82), ligeramente bajo, este se entiende como consecuencia de la elevada concentración de SST y materia orgánica biodegradable existente que favorece los procesos de hidrólisis y fermentación, con la consecuente bajada en el valor de pH.

En el caso del coctel enzimático, tal y como se observa en la Tabla 24, este conservó sus propiedades físico-químicas estables, en línea con las observadas en el conjunto de ensayos con fango secundario.

Tabla 23. Caracterización físico-química del sustrato fango mezcla utilizado en el lote de ensayos "M".

Ensayos	<i>DQO_T</i>	<i>ST</i>	<i>SV</i>	<i>SV</i>	<i>SST</i>	<i>SSV</i>	<i>%SSV</i>	<i>AGV</i>	<i>N-NH₄</i>	<i>P-PO₄</i>	<i>N_T</i>	<i>P_T</i>	<i>pH</i>
	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	%	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	%	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	mg·L ⁻¹	-
M1	42.617	38.424	29.324	76,3%	38.040	31.090	81,7%	1.245	291	386	1.600	698	5,5
M2	68.500	39.034	33.016	84,6%	38.238	33.188	86,8%	1.361	120	153	2.500	1050	6,2
M3	69.000	44.555	37.498	84,2%	40.578	33.494	82,5%	1.829	192	199	2.020	949	6,0
M4	90.300	60.973	48.143	79,0%	50.628	38.950	76,9%	1.715	216	215	1.980	1082	6,0
M5	84.400	45.206	36.820	81,4%	44.408	36.833	82,9%	1.145	189	225	2.600	932	6,2
M6	54.023	32.900	27.802	84,5%	32.537	26.415	81,2%	957	150	206	1.860	785	6,1
M7	57.400	37.481	28.521	76,1%	34.903	26.883	77,0%	1.835	197	166	1.440	636	6,2
M8	57.400	37.481	28.521	76,1%	34.903	26.883	77,0%	1.835	228	195	1.440	636	6,2
M9	40.925	30.877	22.290	72,2%	29.793	22.020	73,9%	1.439	168	230	1.440	701	5,8
M10	51.100	31.564	22.344	70,8%	30.300	21.955	72,5%	2.341	145	243	1.640	592	6,0
M11	68.600	45.491	32.194	70,8%	42.338	30.658	72,4%	3.004	206	124	1.100	391	5,1
M12	66.500	33.500	26.381	78,7%	31.892	25.948	81,4%	2.418	207	352	2.100	790	5,2
M13	53.500	39.980	31.184	78,0%	33.436	26.749	80,0%	2.524	277	391	1.900	827	5,3
PROMEDIO	61.867	39.805	31.080	77,9%	37.076	29.313	78,9%	1.819	199	237	1.817	775	5,8
DESV	14.647	8.065	6.909	4,9%	6.115	5.262	4,4%	607	49	86	434	196	0,4

Tabla 24. Caracterización físico-química de las enzimas fitasas utilizadas en el lote de ensayos "M".

Ensayos	DQO_T	ST	SV	SV	SST	$\%SST$	SSV	$\%SSV$	AGV	$N-NH_4$	$P-PO_4$	N_T	P_T	pH
	$mg \cdot L^{-11}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	-
M1	818.000	621.480	615.003	99,0%	13.665	2,2%	13.530	99,0%	2.201	750	1.073	N/A	N/A	4,3
M2	816.000	613.005	607.040	99,0%	13.824	2,3%	13.693	99,1%	2.053	697	1.146	N/A	1.219	4,6
M3	820.000	654.175	647.292	98,9%	11.162	1,7%	11.010	98,6%	2.400	773	1.243	N/A	1.211	4,0
M4	832.000	627.560	620.811	98,9%	28.830	4,6%	28.555	99,0%	2.742	907	1.111	N/A	1.186	4,3
M5	824.046	632.505	626.303	99,0%	25.320	4,0%	25.065	99,0%	2.904	930	1.111	N/A	1.119	4,2
M6	816.092	622.128	618.530	99,4%	19.285	3,1%	17.385	90,1%	2.876	952	1.130	N/A	1.266	4,2
M7	795.000	627.660	620.870	98,9%	24.850	4,0%	24.565	98,9%	2.963	852	1.125	N/A	1.173	4,8
M8	795.000	627.660	620.870	98,9%	24.850	4,0%	24.565	98,9%	2.963	775	1.029	N/A	1.173	4,8
M9	850.534	621.113	614.530	98,9%	28.950	4,7%	28.670	99,0%	2.764	769	1.044	N/A	N.D.	4,3
M10	640.000 ^(*)	631.578	624.498	98,9%	46.785	7,4%	46.095	98,5%	5.510 ^(*)	902	1.149	N/A	1.184	4,3
M11	811.000	605.365	597.883	98,8%	31.700	5,2%	31.345	98,9%	2.808	901	1.119	N/A	1.182	4,1
M12	868.000	642.753	635.720	98,9%	49.420	7,7%	48.830	98,8%	2.652	873	1.101	N/A	1.244	4,2
M13	779.000	605.800	598.530	98,8%	40.560	6,7%	40.088	98,8%	2.533	801	1.129	N/A	1.163	4,2
PROMEDIO	818.723	625.599	619.068	99,0%	27.631	4,4%	27.184	98,2%	2.655	835	1.116	-	1.193	4,3
DESV	24.167	13.589	13.595	0,2%	12.165	1,9%	12.105	2,4%	300	80	53	-	40	0,3

^(*) Valores anómalos que se excluyen del promedio y desviación calculados; N/A: no aplica; N.D.: no disponible.

Dado que según el estudio ANOVA realizado a partir de los experimentos con fango secundario indicó que la concentración de P_T en el fango podría tener influencia sobre la liberación de $P-PO_4$ por parte de la enzima ($\Delta P-PO_4$ ENZIMA), y considerando las concentraciones de P_T registradas para el fango mezcla empleado en los diferentes ensayos, se decidió subdividir estos en tres grupos:

- **Grupo 1:** Elevada concentración de P_T en el fango mezcla: M2, M3, M4 y M5
- **Grupo 2:** Concentración media de P_T en el fango mezcla: M1, M6, M7, M8, M9, M12 y M13.
- **Grupo 3:** Baja concentración de P_T en el fango mezcla: M10 y M11.

Por otra parte, el análisis de la varianza (ANOVA) realizado indica que el P_T y el P_{org} disponible tienen un efecto sobre las variables $\Delta P-PO_4$ ENZIMA y eficacia ($pvalor < 0,05$). Esto sugiere que diferentes cargas de P_T al sistema pueden generar liberaciones y eficacias distintas. Sin embargo, la dosis no tiene un efecto sobre ninguna de las variables respuesta ($\Delta P-PO_4$ ENZIMA y eficacia).

A continuación, se presentan y analizan los resultados obtenidos en los ensayos del lote M, organizados según los grupos definidos en función de la concentración de P_T en el fango mezcla.

En el **Grupo 1** (ver Figura 40, Figura 41, Figura 42 y Figura 43), la concentración de P_T osciló entre valores de $932 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.082 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo los más elevados registrados para este lote ensayos. En este caso, a pesar de que todos los ensayos se realizaron en las mismas condiciones operativas de temperatura y duración experimental (35°C y 22 horas), durante el muestreo del ensayo M3 a las 2, 4, 6 y 8 horas se realizó un ajuste de pH mediante la adición de gotas de NaOH en los reactores con adición de enzima. El objetivo que se perseguía era comprobar si el control de pH promovía la hidrólisis realizada por acción de las enzimas fitasa. Este ensayo se consideró necesario debido a que, en los ensayos enzimáticos previos, el pH del sistema se encontraba fuera del intervalo óptimo de actuación de la fitasa (pH 5,5–6,6), lo que podría haber limitado su eficacia.

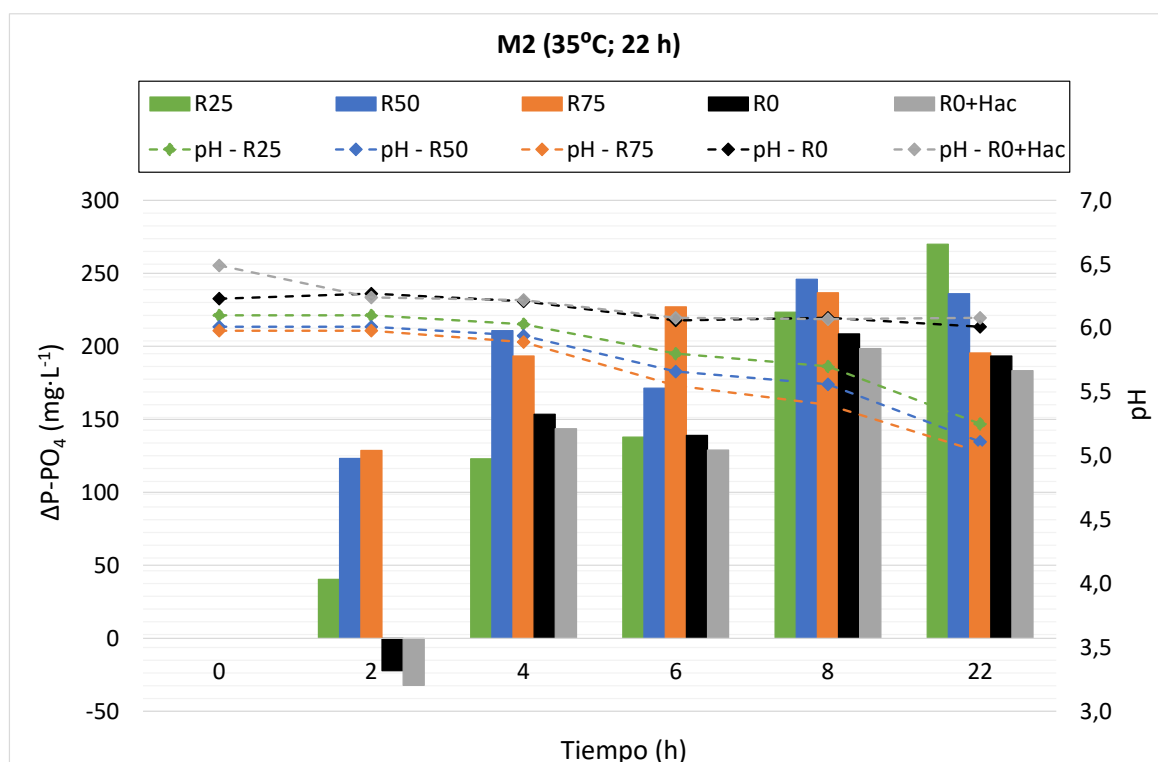


Figura 40. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M2".

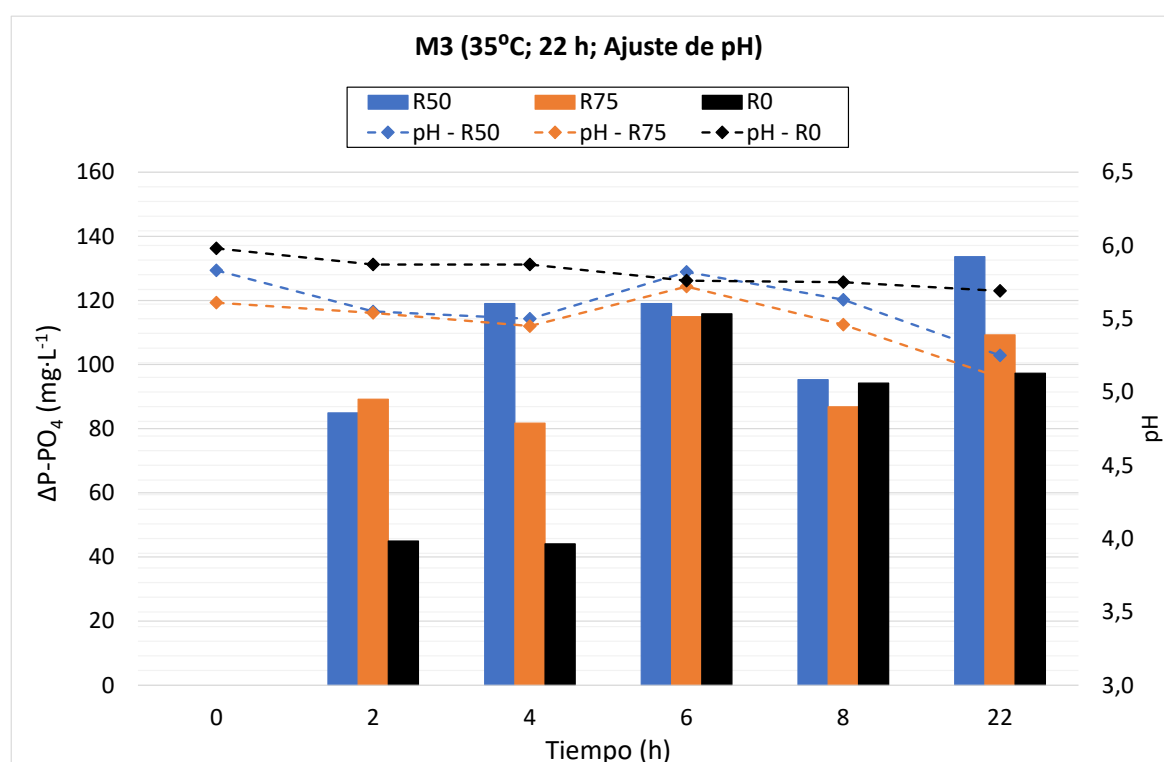


Figura 41. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M3".

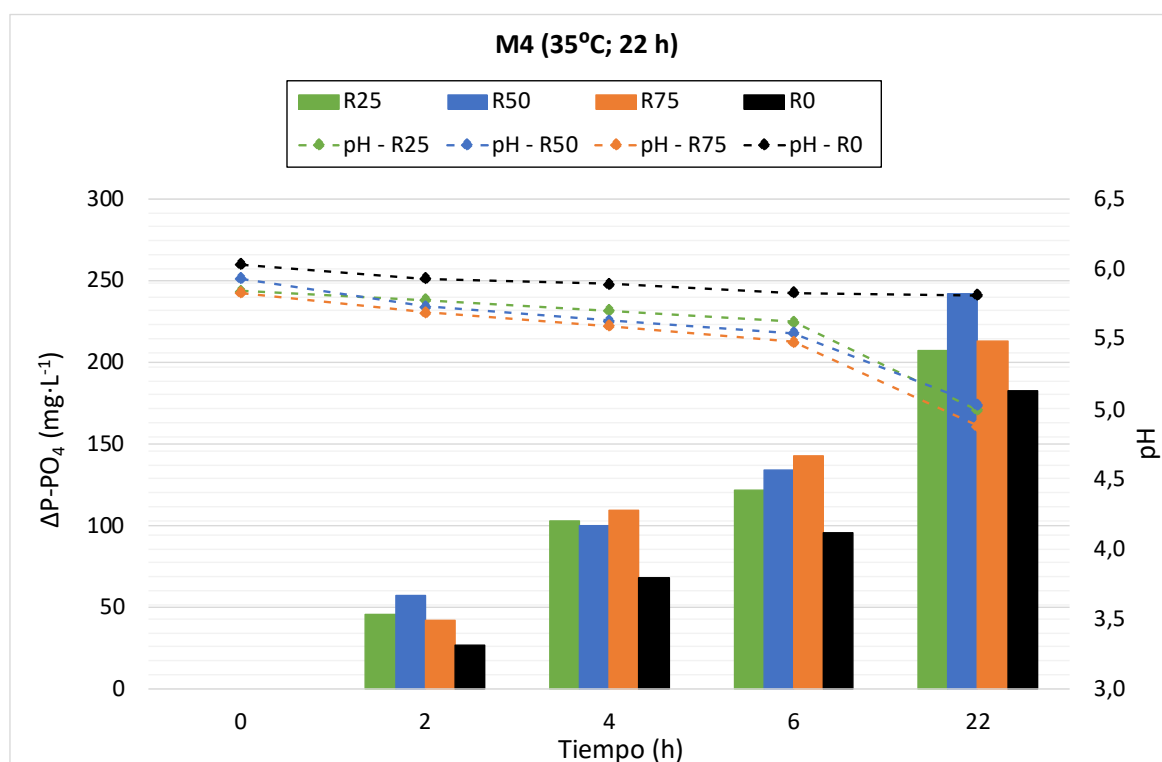


Figura 42. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M4".

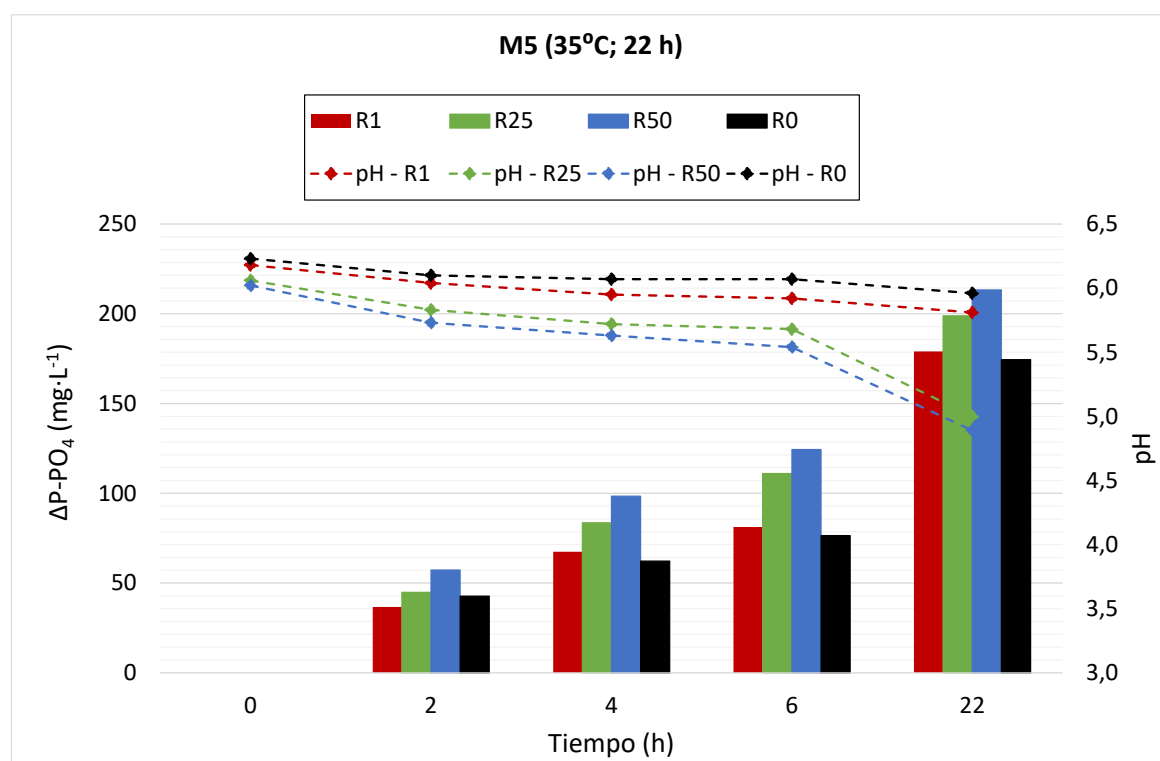


Figura 43. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M5".

En general, para los ensayos M2, M3, M4 y M5, durante las primeras 6-8 horas, tanto para los reactores control (R0) como para los reactores con adición de enzima fitasa, se observaron liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ que oscilaron entre 174,5 mg $P \cdot L^{-1}$ y 270,0 mg $P \cdot L^{-1}$. Únicamente se observaron dos decrementos de $P-PO_4$ puntuales para R0 y R0+Hac a las 2 horas desde el inicio del ensayo M2, del orden de 22 a 32 mg $P \cdot L^{-1}$, lo que se podría achacar a una adsorción de fosfato en el medio que no se mantiene en el tiempo.

Las liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ a las 22 horas en los reactores R0 (sin adición de enzima) registraron valores entre 174,5 mg $P \cdot L^{-1}$ y 193,4 mg $P \cdot L^{-1}$. Estas se atribuyen a la actividad hidrolítica de las bacterias acidogénicas presentes en el fango mezcla. En este grupo, el reactor R0+Hac se implementó únicamente en el ensayo M2. Los resultados obtenidos mostraron la misma tendencia que en el reactor R0, lo que indica que no existe liberación extra del Poly-P almacenado intracelularmente en las bacterias PAO, a pesar de proporcionar una elevada concentración de AGV al medio.

Las liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ a las 22 horas en los reactores con adición de enzima se deben a la acción conjunta de la hidrólisis llevada a cabo por las bacterias acidogénicas y la enzima fitasa. En el ensayo M2, se alcanzaron liberaciones de 270,0 mg $P \cdot L^{-1}$ en R25, 236,0 mg $P \cdot L^{-1}$ en R50 y 195,5 mg $P \cdot L^{-1}$ en R75, siendo R25 la dosis más efectiva. En el ensayo M3, con control de pH, se obtuvieron 133,6 mg $P \cdot L^{-1}$ en R50 y 109,3 mg $P \cdot L^{-1}$ en R75. Cabe destacar que en M3 no se puso en marcha el reactor R25, por lo que no se dispone de un valor experimental de referencia para este caso. En el ensayo M4, los valores registrados fueron 207,0 mg $P \cdot L^{-1}$ en R25, 242,2 mg $P \cdot L^{-1}$ en R50 y 212,9 mg $P \cdot L^{-1}$ en R75, observándose una mayor liberación en R50. Finalmente, en el ensayo M5, se obtuvieron 198,8 mg $P \cdot L^{-1}$ en R25 y 213,2 mg $P \cdot L^{-1}$ en R50, siendo R50 la dosis que produjo la mayor liberación. La dosis R1, del ensayo M5, mostró una liberación acumulada de $P-PO_4$ a las 22 horas similar a la registrada para el reactor R0 indicando que esta dosis (1% de la dosis óptima indicada por el fabricante), no ejerció un efecto significativo sobre la liberación de P. En conjunto, los resultados obtenidos en los ensayos del Grupo 1 indican que la dosis intermedia (R50) fue generalmente la más efectiva para maximizar la liberación de $P-PO_4$, excepto en el caso de M2, donde R25 presentó un rendimiento superior.

Por lo tanto, al comparar los resultados obtenidos a las 8 y a las 22 horas, se aprecia que, si bien durante las primeras 8 horas se alcanzaron liberaciones significativas de $P-PO_4$, en la mayoría de los casos se registraron incrementos adicionales relevantes (de hasta $108 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$) entre las 8 y las 22 horas. Esto evidencia que el proceso de liberación no se agota durante estas primeras 8 horas, sino que continua de forma progresiva. Este comportamiento sugiere que el sistema continúa liberando P durante las siguientes horas, ya sea por una hidrólisis natural del fango y/o por una actuación prolongada de la enzima. Por tanto, el análisis a 22 horas ofrece una visión más completa y representativa del rendimiento final del proceso de liberación de $P-PO_4$ en cada reactor.

En cuanto a la evolución del pH, en los ensayos M2, M4 y M5 cabe resaltar que en los reactores sin enzima el pH se mantiene relativamente estable en el tiempo. En contraste, en los reactores R25, R50 y R75, se evidencia una disminución gradual del pH, especialmente pronunciada entre las 8 y las 22 horas. Esta caída se relaciona con la acumulación de AGV en el medio, resultado de la hidrólisis acidogénica promovida por la acción de las enzimas fitasas. Así mismo, cabe resaltar que, al igual que en el Lote de ensayos S, los reactores con enzima presentan un valor inicial de pH más bajo debido al propio carácter ácido de la solución enzimática. No obstante, en este caso, la diferencia inicial de pH entre los reactores con y sin enzima es menos pronunciada que la observada en los ensayos S. Esto es debido a que el pH inicial del fango mezcla presenta valores más bajos que el del fango secundario. En el caso de M3, los reactores con adición de enzima muestran una leve tendencia descendente del valor de pH entre las 0 y las 8 horas debido a que se estableció un ajuste de pH con NaOH, evitando la caída del pH que se mantuvo dentro del intervalo óptimo (5,5 - 6,6) para la actividad enzimática durante las primeras 8 horas. Entre las 8 y las 22 horas de ensayo, ya no se realizaron ajustes adicionales, por lo que se observa una caída más acusada del pH en ambos reactores, especialmente en R75, donde el valor cae por debajo de 5,2, saliéndose del intervalo óptimo de operación de la enzima. La tendencia descendente del pH se achaca a la acumulación de AGV en el medio, al igual que en los anteriores ensayos. Dado que no se observa una mejora en la liberación de fosfato mediante el ajuste de pH con respecto a los valores obtenidos en ensayos previos, esta práctica no se continúa repitiendo en los ensayos posteriores.

En el **Grupo 2** (ver Figura 44, Figura 45, Figura 46, Figura 47, Figura 48, Figura 49 y Figura 50), la concentración de P_T osciló entre valores de 636 mg $P \cdot L^{-1}$ y 827 mg $P \cdot L^{-1}$, considerados como intermedios para el lote de ensayos M. Al igual que en el Grupo 1, estos ensayos se realizaron en las mismas condiciones operativas de temperatura y duración experimental (35°C y 22 horas). Por otro lado, cabe destacar que se realizó un barrido más exhaustivo de las dosis de enzima fitasa incorporando la evaluación de dosis comprendidas entre el 0,5 % y el 15% de la dosis óptima indicada por el proveedor de la enzima. Así mismo, se mantuvo la evaluación de las dosis habituales del 25%, 50% y 75%, correspondientes a los reactores R25, R50 y R75, respectivamente. El objetivo de esta estrategia fue analizar con mayor precisión la relación dosis-respuesta y optimizar la concentración enzimática para maximizar la liberación de P. Cabe señalar que dentro del Grupo 2 se llevaron a cabo dos procedimientos diferentes para el seguimiento de los ensayos: i) muestreo cada 2 horas durante las primeras 6–8 horas, complementado con una medición final a las 22 horas, y ii) muestreo al inicio del ensayo (0 horas) y al final (22 horas). Este último procedimiento se adoptó tras los primeros ensayos al no identificar un patrón claro en la evolución temporal de las liberaciones de $P-PO_4$ que permitiera una comparación consistente entre experimentos y al observarse que las mayores liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ se producían al alcanzar el tiempo máximo evaluado (22 horas).

Durante las primeras horas de ensayo, entre las 0 y las 6-8 horas (Grupo 2, ensayos M1, M6 y M7) se observaron liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ de valores que oscilan entre 13,8 mg $P \cdot L^{-1}$ y 78,5 mg $P \cdot L^{-1}$, excepto para M1. Para este último, se observaron pérdidas de $P-PO_4$ en los reactores R0 y R0+Hac, posiblemente producidas debido a adsorciones de $P-PO_4$ durante las primeras horas del experimento. Posteriormente, estas concentraciones volvieron a aumentar debido bien a la desorción de $P-PO_4$ o bien a las liberaciones de $P-PO_4$ por hidrólisis.

En los reactores control (R0), tras las 22 horas, se registraron valores de liberación acumulada de $P-PO_4$ entre 40,5 mg $P \cdot L^{-1}$ y 112,6 mg $P \cdot L^{-1}$. En este grupo, el reactor R0+Hac únicamente se puso en marcha para el ensayo M1, observándose que no existía ninguna liberación de $P-PO_4$ asociada a la adición de ácido acético.

En los reactores con adición de enzima, las liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ a las 22 horas evidenciaron diferencias notables entre experimentos y dosis aplicadas. En el experimento M1, R25 presentó la mayor liberación ($173,4 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$) aunque con un valor muy cercano a R75. Estos resultados sugieren que, en este ensayo, la dosis R25 produce resultados comparables a la dosis R75 ($173,0 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$) a las 22 horas. En M6, se registraron valores de liberaciones de $P-PO_4$ acumuladas de $124,6 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$ en R25, $106,5 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$ en R50 y $122,5 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$ en R75, siendo de nuevo R25 el mejor resultado. En M7, liberaciones de $P-PO_4$ acumuladas fueron $72,0 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$ en R1 y $81,8 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$ en R25, destacando R25 como la dosis óptima dentro de este ensayo.

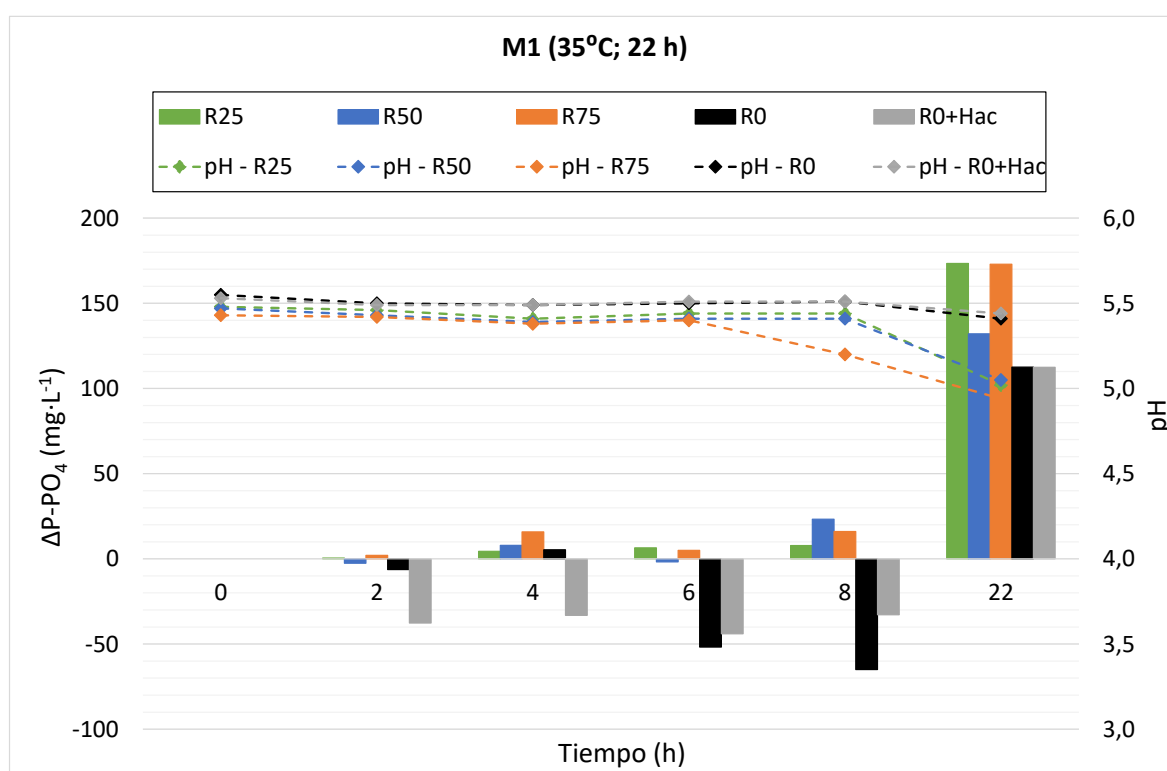


Figura 44. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M1".

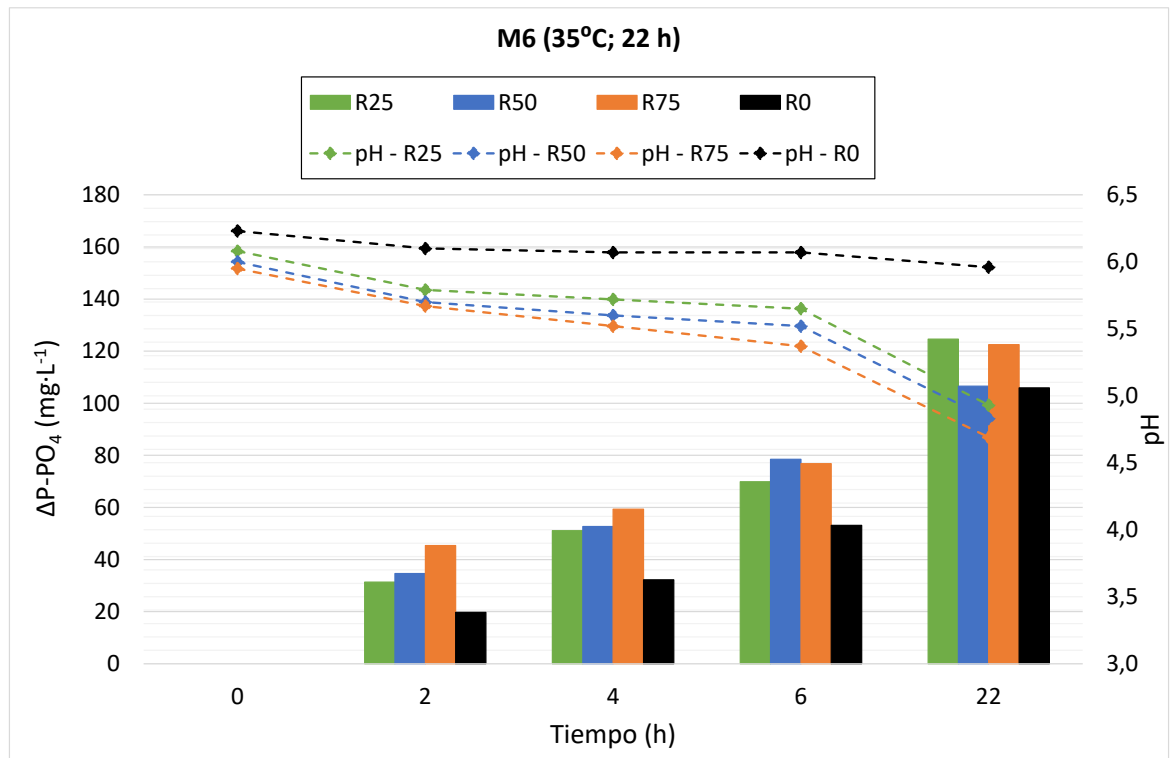


Figura 45. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M6".

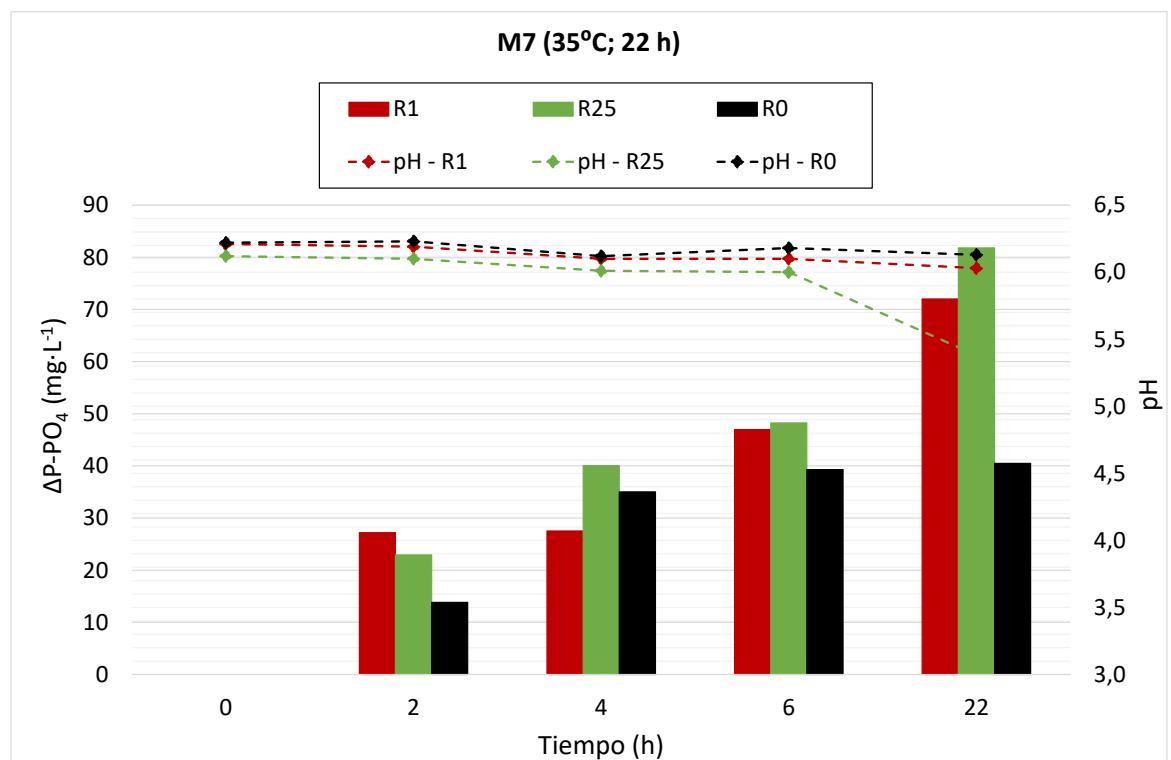


Figura 46. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M7".

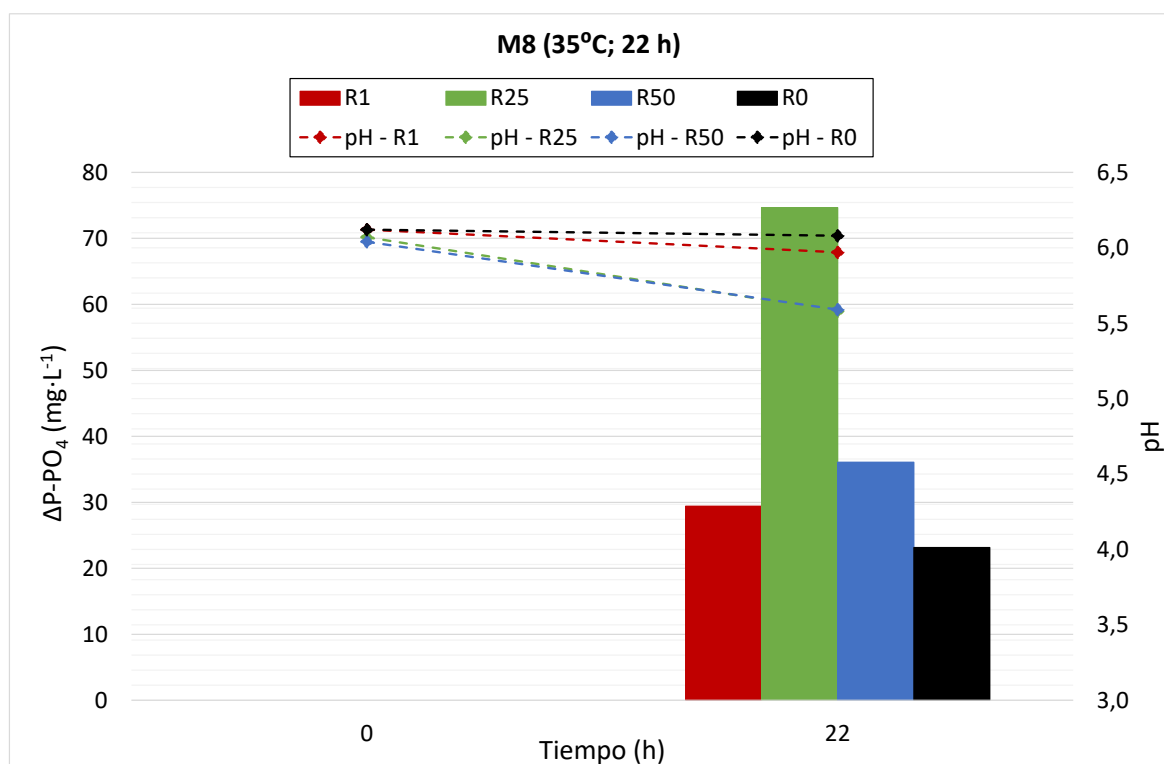


Figura 47. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M8".

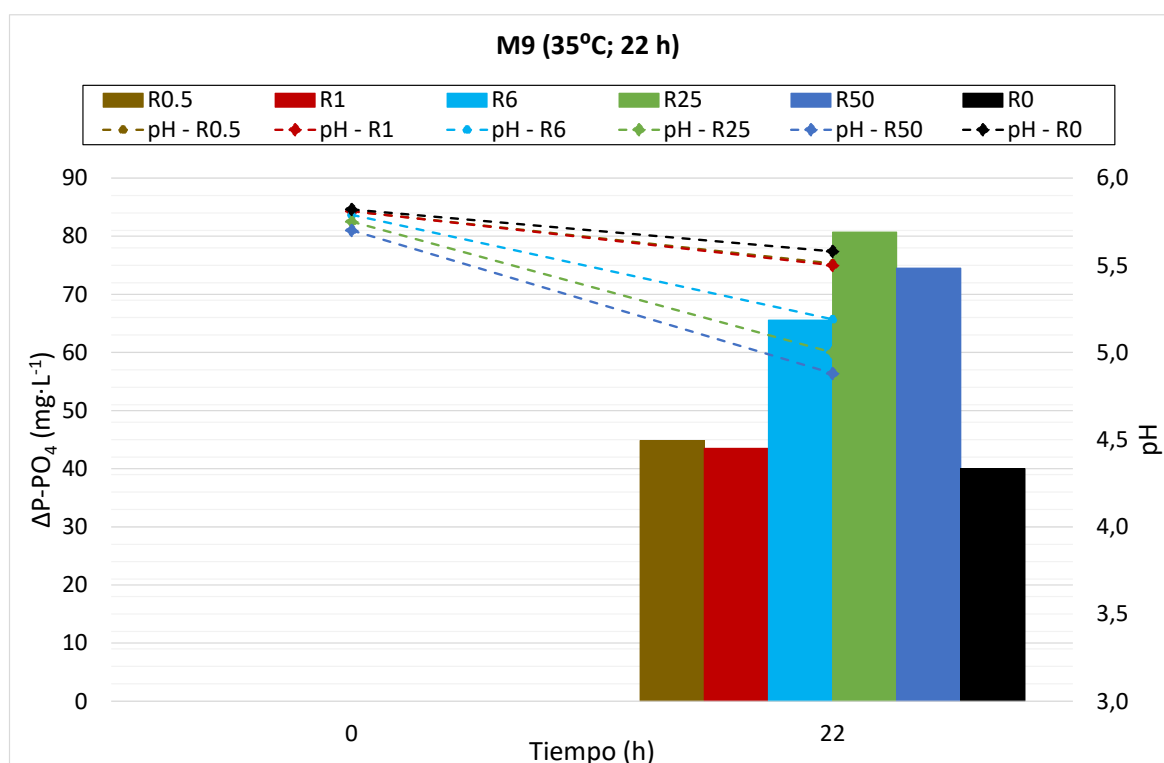


Figura 48. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M9".

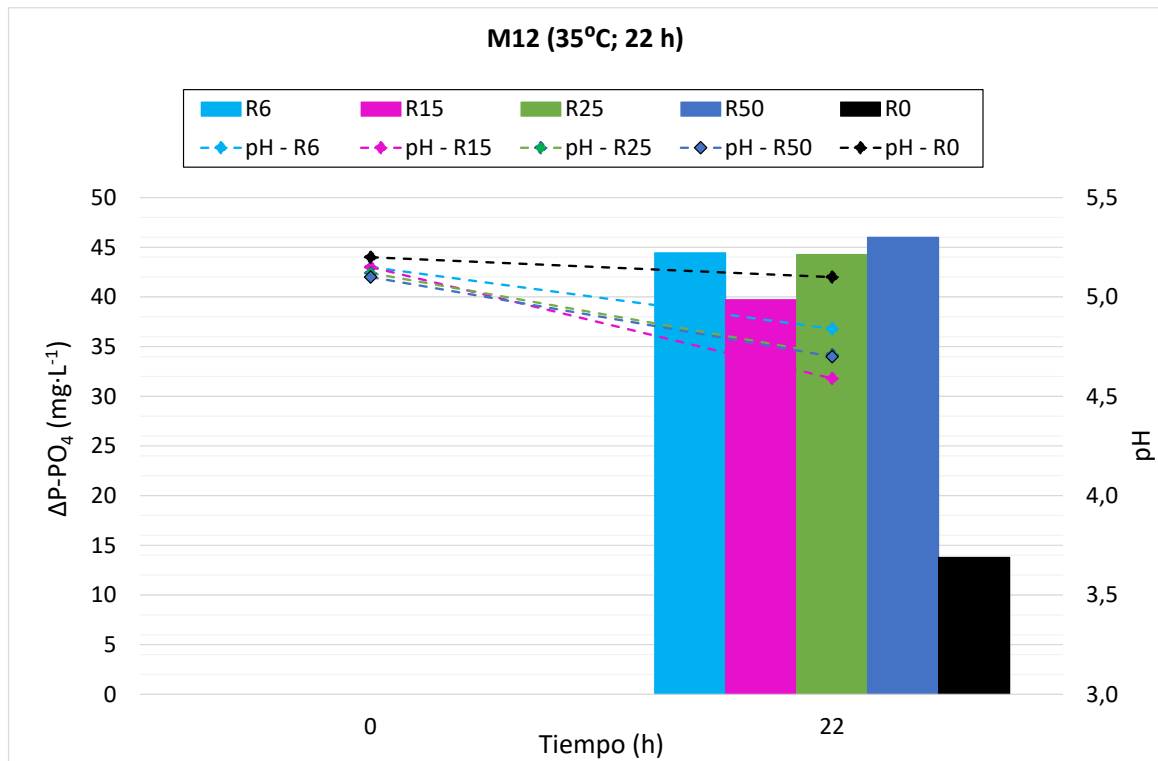


Figura 49. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M12".

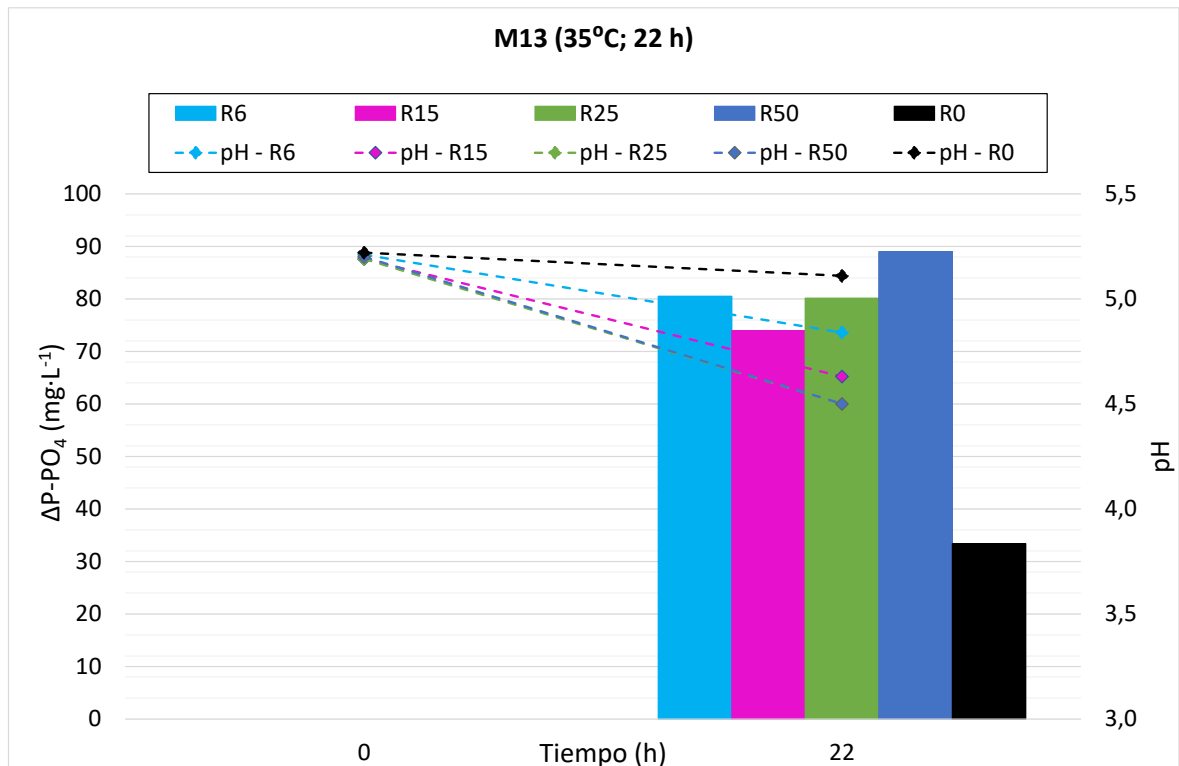


Figura 50. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puestos en marcha en el ensayo "M13".

En conjunto, los resultados muestran que prolongar el tiempo de ensayo hasta 22 horas incrementa significativamente la liberación de $P\text{-PO}_4$ respecto a los valores alcanzados a las 8 horas. En los ensayos M1, M6 y M7, se registraron aumentos de hasta $165,6 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ entre los tiempos 8 y 22 horas, lo cual refuerza la necesidad de mantener un periodo prolongado de reacción para maximizar la eficacia del proceso.

En el caso de los ensayos del Grupo 2, cuyo seguimiento se realizó únicamente en los tiempos 0 y 22 horas, se observa lo siguiente: para M8, se obtuvieron liberaciones de $29,4 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R1, $74,7 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R25 y $36,1 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R50, siendo claramente superior R25, indicando nuevamente que esta dosis resultó más efectiva que una mayor. En M9 se evaluaron múltiples dosis, obteniéndose los siguientes resultados de liberación acumulada de $P\text{-PO}_4$: $44,8 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R0,5, $43,5 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R1, $65,6 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R6, $80,7 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R25 y $74,5 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R50; el valor más alto se dio en R25, lo cual indica que dicha dosis fue suficiente para alcanzar una liberación elevada. En M12, se obtuvieron valores en torno a los $40\text{-}46 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ para todas las dosis ensayadas, siendo la R50 la que mostró mejor resultado. Finalmente, en M13 de nuevo R50 presentó la mayor liberación acumulada ($89,0 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$) aunque muy similar a la alcanzada con R6 y R25 ($\approx 80 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$). Al igual que en el Grupo 1 de ensayo, estas liberaciones se atribuyen a la acción combinada de las bacterias acidogénicas y las enzimas fitasas durante la hidrólisis.

Así, para el Grupo 2 de ensayos, el mejor resultado de liberación acumulada de $P\text{-PO}_4$ se obtuvo en M1-R25 ($173,4 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$), seguido muy de cerca por M1-R75 ($173,0 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$). Esta escasa diferencia entre ambas condiciones sugiere que, a partir de cierta dosis de fitasa, un incremento adicional no necesariamente mejora la liberación de P. En cuanto al pH, se repite el patrón observado en el Grupo 1 de ensayos. Es decir, en los reactores sin adición de enzima, el pH se mantiene más estable a lo largo del experimento, mientras que en los reactores con adición de fitasa se aprecia una disminución del pH, siendo esta caída más pronunciada a medida que aumenta la dosis de enzima aplicada.

En el **Grupo 3** de ensayos (ver Figura 51 y Figura 52), las concentraciones de P_T fueron de $592 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en M10 y de $391 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en M11, valores relativamente bajos en comparación con el

resto del lote experimental de ensayos con fango mezcla (Lote M). Estos ensayos se desarrollaron bajo las mismas condiciones operativas de temperatura (35°C) y duración (22 horas) que los Grupos 1 y 2.

En ambos ensayos (M10 y M11), para el reactor R0 a las 22 horas se observa la misma tendencia que en los anteriores ensayos, es decir, una liberación acumulada de P-PO₄ debida a la hidrólisis de las bacterias acidogénicas presentes en el fango mezcla.

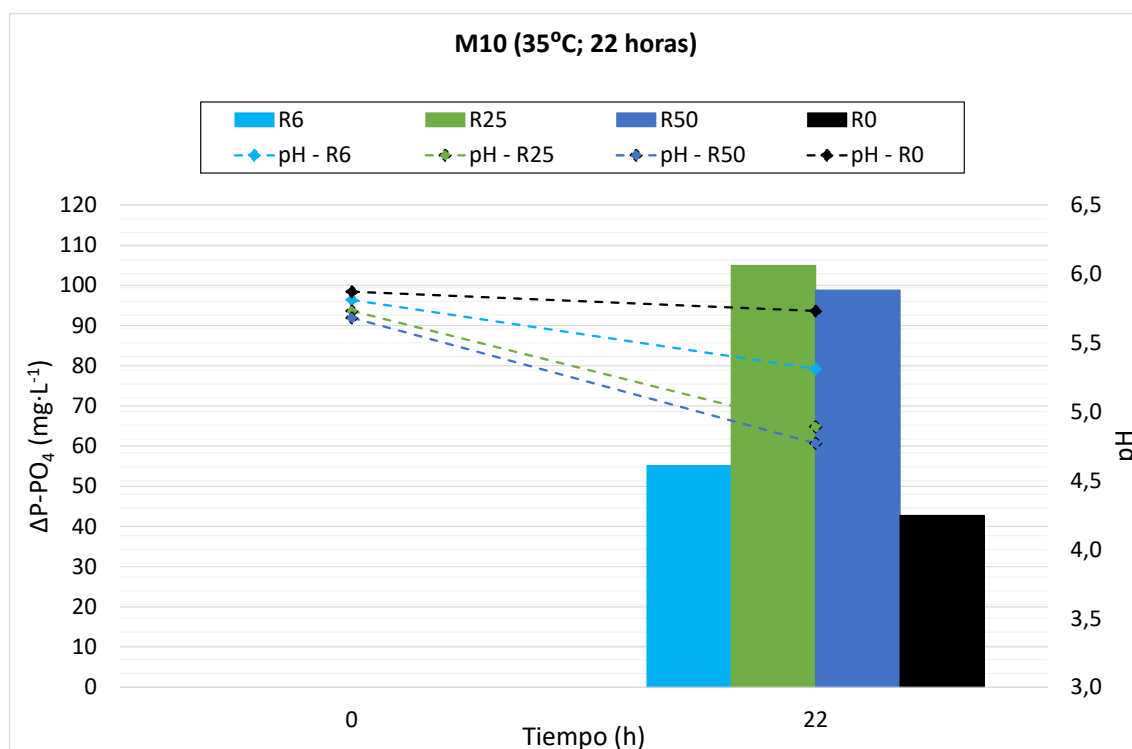


Figura 51. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "M10".

En cuanto a los reactores con adición de enzima, a las 22 horas se observaron las siguientes liberaciones acumuladas de P-PO₄ para M10: 55,2 en mg P·L⁻¹ en R6, 104,9 mg P·L⁻¹ en R25 y 98,8 mg P·L⁻¹ en R50, obteniéndose el mejor resultado para R25. En M11 los valores fueron de 24,0 mg P·L⁻¹ en R6 y 24,3 mg P·L⁻¹ en R25, mostrando valores muy similares entre las distintas dosis ensayadas. Esta escasa variación sugiere que, en este caso, la dosis de enzima fitasa no tuvo un impacto significativo en la liberación de P, y que incluso con una dosis baja (R6) se alcanzaron niveles comparables a los obtenidos con dosis mayores. El pH, tanto en el ensayo M10 como en M11 siguió

la misma evolución que en los Grupos 1 y 2, tanto para los reactores R0 como para los que contaban con adición de enzima.

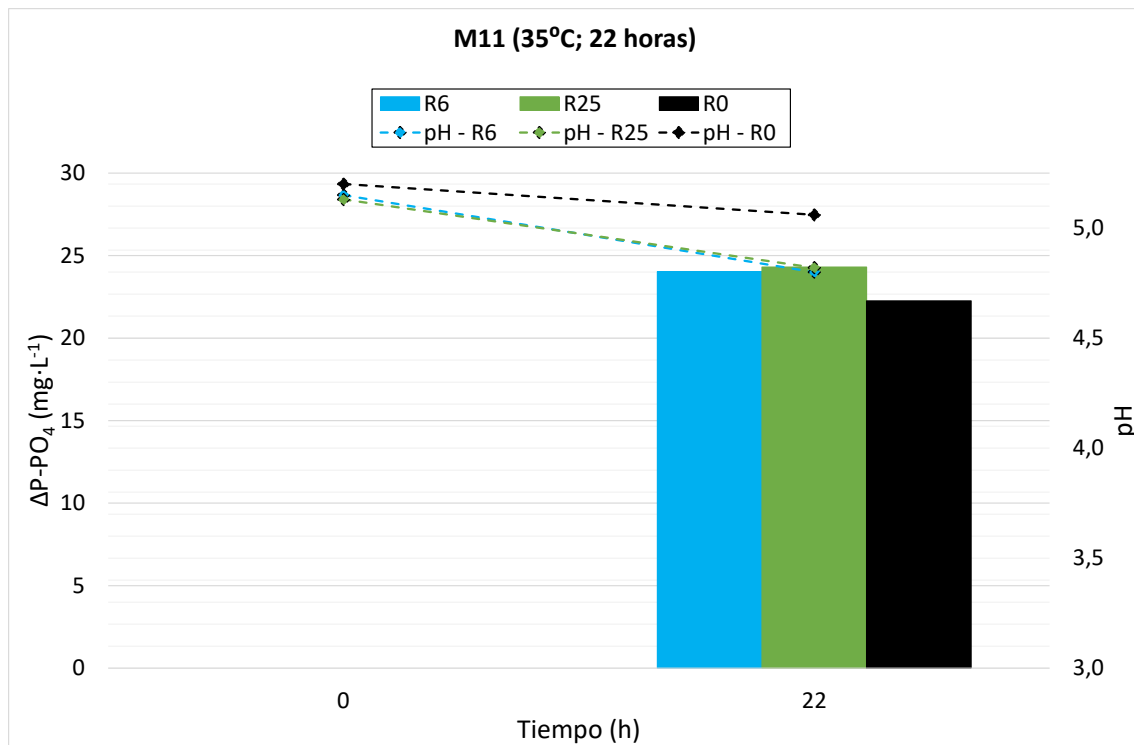


Figura 52. Evolución de la acumulación de $P\text{-PO}_4$ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "M11".

La Tabla 25 recoge los principales parámetros utilizados para evaluar la eficacia de la liberación de P inducida por la acción de las enzimas fitasa en los ensayos del Lote M-Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3. Se presentan los valores iniciales de P_T y $P\text{-PO}_4$ del fango mezcla empleado, a partir de los cuales se calcularon los parámetros $P_{\text{org disponible}}$ y $P_{\text{org hidrolizado}}$. Asimismo, se incluyen los resultados obtenidos de los ensayos enzimáticos, como la liberación neta de $P\text{-PO}_4$ atribuible a la acción de las fitasas ($\Delta P\text{-PO}_4_{\text{ENZIMA}}$) y el porcentaje de eficacia del proceso, definidos previamente en el apartado 3.7.2 de la METODOLOGÍA.

En la Tabla 25 se aprecia que, en el **Grupo 1**, los valores de $P_{\text{org disponible}}$ también se consideran elevados, situándose entre $707 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $897 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$. Esto se relaciona con los bajos porcentajes de $P_{\text{org hidrolizado}}$ (entre el 15% y el 24%), lo que refleja que una baja proporción del P_T se encuentra en forma de $P\text{-PO}_4$, indicando así una mayor cantidad de P disponible en el fango.

En el ensayo M2, la mayor liberación neta de $P-PO_4$ ($\Delta P-PO_4_{ENZIMA}$) se produjo en el reactor R25, mientras que en R50 se redujo, y en R75 prácticamente no se observó efecto hidrolítico por parte de las enzimas fitasa. Esto sugiere que, en este caso, un exceso de enzima podría haber generado condiciones menos favorables para la liberación, posiblemente por acidificación excesiva o saturación del sistema.

En M3, donde se aplicó un ajuste de pH, la liberación fue más efectiva en R50 que en R75, lo que refuerza la idea de que una dosis media puede ser más efectiva que una alta. Además, el control de pH no produjo una mejora significativa en la liberación de P.

En el ensayo M4 la mayor liberación neta de $P-PO_4$ se observó en R50, seguido de R75 y luego R25. En este caso, la dosis aplicada en R50 volvió a ser la más eficaz. Sin embargo, a diferencia de lo observado en M2, tanto en R25 como en R75 se observaron liberaciones netas significativas. Este comportamiento podría atribuirse a una mayor disponibilidad de ácido fítico en el sistema, favoreciendo una liberación considerable de $P-PO_4$ en todas las dosis evaluadas.

En M5 se incluyó un reactor adicional (R1), al que se añadió una dosis muy reducida de enzima con el objetivo de evaluar el efecto de concentraciones mínimas sobre la liberación de P. Este reactor mostró una liberación neta de $P-PO_4$ muy baja. Aunque la dosis más alta (R50) obtuvo la mayor liberación, R25 también alcanzó un valor considerable, combinando una liberación significativa con un menor consumo de enzima.

Analizando los porcentajes de eficacia de liberación de $P-PO_4$, el ensayo M2 R25 presentó el mejor resultado, superando a R50 y R75. En M3, aunque R50 fue más efectivo que R75, se observó que la diferencia en la liberación de $P-PO_4$ con respecto a otros reactores no fue significativa. Esto sugiere que, aunque se incrementó la dosis de enzima, el efecto sobre la liberación de P no fue tan pronunciado como se esperaba. En M4, las tres dosis mostraron valores similares, destacándose nuevamente R50, pero con R25 manteniendo una eficacia en el mismo orden de magnitud que el resto de las dosis. En M5, R25 superó claramente al R1 y se acercó a R50.

En conjunto, en los experimentos realizados con fango con concentraciones de P_T elevadas los resultados indican que R25 ofrece una buena eficiencia de liberación de $P-PO_4$, combinando rendimiento aceptable y un uso más económico de la enzima, posicionándose como una dosis recomendada.

En el **Grupo 2** (ver Tabla 25), para los ensayos M6, M7, M8 y M9, los resultados de P_{org} disponible (entre 449 mg $P \cdot L^{-1}$ y 579 mg $P \cdot L^{-1}$) y de P_{org} hidrolizado en el fango (entre el 26% y el 33%) se sitúan en un rango intermedio en comparación con el resto del lote “M”. Por el contrario, en los ensayos M1, M12 y M13 se registraron valores más bajos de P_{org} disponible (312 mg $P \cdot L^{-1}$, 438 mg $P \cdot L^{-1}$ y 436 mg $P \cdot L^{-1}$, respectivamente), lo cual se tradujo en porcentajes de P_{org} hidrolizado más elevados (entre 45% y 55%), reflejando un mayor grado de hidrólisis previa del P_T .

Tabla 25. Ensayos correspondientes al Grupo 1 - lote “M” realizados a temperatura de operación 35°C y tiempo experimental 22 horas.

Ensayos	Reactor	P _T	P-PO ₄	P _{org} disponible	P _{org} hidrolizado	ΔP-PO ₄ ENZIMA	Eficacia
		mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
Lote M - Grupo 1							
M2	R25	1050	153,0	897	15	77	8,5
	R50					43	4,8
	R75					2	0,2
M3	R50	949	207,7	741	22	36	4,9
	R75					12	1,6
M4	R25	1082	215,2	867	20	24	2,8
	R50					59	6,8
	R75					30	3,5
M5	R1	932	224,5	707	24	5	0,6
	R25					24	3,4
	R50					39	5,5

Ensayos	Reactor	P _T	P-PO ₄	P _{org} disponible	P _{org} hidrolizado	ΔP-PO ₄ ENZIMA	Eficacia
		mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
Lote M - Grupo 2							
M1	R25	698	386,0	312	55	61	19,5
	R50					20	6,3
	R75					60	19,4
M6	R25	785	206,3	579	26	19	3,2
	R50					1	0,1
	R75					17	2,9
M7	R1	636	166,5	470	26	32	6,7
	R25					41	8,8
M8	R1	636	186,9	449	29	6	1,4
	R25					52	11,5
	R50					13	2,9
M9	R0.5	701	230,2	471	33	5	1,0
	R1					4	0,7
	R6					26	5,4
	R25					41	8,6
	R50					35	7,3
M12	R6	790	352,4	438	45	31	7,0
	R15					26	5,9
	R25					31	7,0
	R50					32	7,4
M13	R6	827	391,1	436	47	47	10,8
	R15					41	9,3
	R25					47	10,7
	R50					56	12,8

Ensayos	Reactor	P _T	P-PO ₄	P _{org} disponible	P _{org} hidrolizado	ΔP-PO ₄ ENZIMA	Eficacia
		mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
Lote M - Grupo 3							
M10	R6	592	242,5	349	41	13	3,6
	R25					62	17,8
	R50					56	16,0
M11	R6	391	123,6	267	32	2	0,7
	R25					2	0,8

En los ensayos con bajo contenido de P_{org} disponible (M1, M12 y M13), la eficacia de liberación de P-PO₄ fue, en general, reducida. En M1, tanto R25 como R75 mostraron valores similares de eficacia, superiores a los obtenidos en R50. En M12 y M13, no se observaron diferencias destacables entre las distintas dosis ensayadas, con eficacias moderadas y similares entre sí.

En los ensayos con contenido intermedio de P_{org} disponible (M6, M7, M8 y M9), se observó una mayor variabilidad. En M6, R25 y R75 presentaron mejores resultados que R50. En M7 y M8, R25 ofreció las mayores liberaciones de P-PO₄, mientras que en M9 se observó una tendencia creciente desde R0,5 hasta R25, aunque R50 no mejoró significativamente los resultados obtenidos con R25.

Respecto a la eficacia, los resultados de M6 reflejan valores bajos en todas las dosis, especialmente en R50. En M7 y M8, R25 alcanzó los porcentajes más altos de eficacia. En M9, se observó un incremento progresivo desde R0,5 hasta R25, con una ligera reducción en R50. Esto sugiere que, en la mayoría de los casos, R25 proporcionó un buen equilibrio entre cantidad de P liberado y eficiencia del proceso, sin que dosis superiores supongan mejoras significativas.

En conjunto, los experimentos realizados con fangos con concentraciones intermedias de P_T indican que la dosis R25 ofrece un rendimiento consistente en la liberación de P-PO₄, combinando una eficacia adecuada con una respuesta favorable en términos de liberación de P-PO₄.

Por último, en el **Grupo 3** se observa que el $P_{\text{org disponible}}$ es bajo con respecto a lo observado en los otros grupos (entre $267 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ y $349 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$), lo que indica una menor cantidad de P orgánico susceptible de liberación en estos ensayos. Sin embargo, en M10 se destaca un porcentaje de $P_{\text{org hidrolizado}}$ alto (41%), mientras que en M11 el valor es intermedio (32%), lo que sugiere que en estos fangos ya existe una proporción relevante de P en forma de P-PO_4 .

En el ensayo M10, la dosis R25 mostró un buen equilibrio entre liberación neta de P-PO_4 y eficacia, con resultados comparables a R50, lo que sugiere que no es necesario aumentar la dosis para mejorar el rendimiento. En cambio, en M11, caracterizado por un contenido especialmente bajo de P_T , todas las dosis ensayadas mostraron una respuesta muy limitada, tanto en términos de liberación como de eficacia, lo que sugiere que, en estas condiciones, el proceso resultó poco eficiente con independencia de la dosis aplicada.

En conjunto, los ensayos del Grupo 3 reflejan que, en condiciones de menor contenido de P_T , la dosis R25 continúa siendo la opción más competitiva para maximizar la liberación de P-PO_4 sin necesidad de recurrir a dosis excesivamente altas.

Si bien los resultados analizados para los ensayos con fango mezcla parecen indicar que la dosis más efectiva sería R25 ($25 \text{ g enzima} \cdot \text{kg}^{-1}$ fango), la variabilidad observada en los diferentes ensayos para las variables respuesta del proceso ($\Delta\text{P-PO}_4 \text{ ENZIMA}$ y eficacia) requieren de un análisis en mayor profundidad. Para ello, se ha realizado un estudio estadístico a partir de la información recopilada en los ensayos. Del estudio se han excluido los ensayos M3 y M11 por haber sido realizados con ajuste de pH o haber presentado un comportamiento claramente anómalo. Para el estudio estadístico se han tenido en cuenta parámetros ambientales (características del fango, es decir P_T , P-PO_4 , $P_{\text{org disponible}}$ y $P_{\text{org hidrolizado}}$), parámetros operacionales del proceso (dosis de enzima aplicada) y las variables respuesta ($\Delta\text{P-PO}_4 \text{ ENZIMA}$ y eficacia).

La Tabla 26 muestra las correlaciones y los p-valores para las variables de estudio analizadas. Como se puede observar el P_T correlaciona positivamente con el $P_{\text{org disponible}}$ y negativamente con el $P_{\text{org hidrolizado}}$. De igual manera el P-PO_4 inicialmente presente en el fango correlaciona con estas

variables de manera inversa. Esto sugiere que para este tipo de fango a mayor concentración de P_T existe un mayor P_{org} disponible y, por tanto, un mayor potencial de acción de la enzima. Sin embargo, la correlación con el $P-PO_4$ inicial es inversa, es decir, que para este tipo de fango a mayor P_{org} disponible menor concentración de $P-PO_4$ inicial. Respecto a la eficacia del proceso esta variable se correlaciona positivamente con el $P-PO_4$ y el P_{org} hidrolizado y de forma negativa con el P_{org} disponible. Un mayor grado de hidrólisis del fango (mayor $P-PO_4$ inicial del fango y, por tanto, mayor P_{org} hidrolizado) implica una menor cantidad de P_{org} disponible lo que puede acarrear un aumento de la eficacia (Ec. 7). Por último, cabe destacar que la dosis correlaciona significativamente y de forma positiva tanto con el $\Delta P-PO_4$ ENZIMA como con la eficacia.

Tabla 26. Correlaciones entre variables implicadas en el estudio enzimático con fango mezcla ($\alpha = 0,05$).

	P_T	$P-PO_4$	P_{org} disponible	P_{org} hidrolizado	$\Delta P-PO_4$ ENZIMA	Eficacia	Dosis
P_T							
<i>p-value</i>							
$P-PO_4$							
<i>p-value</i>							
P_{org} disponible	0,90	-0,57					
<i>p-value</i>	0,0000	0,0005					
P_{org} hidrolizado	-0,54	0,90	-0,85				
<i>p-value</i>	0,0000	0,0000	0,0000				
$\Delta P-PO_4$ ENZIMA							
<i>p-value</i>							
Eficacia		0,48	-0,50	0,59	0,83		
<i>p-value</i>		0,0047	0,0032	0,0003	0,0000		
Dosis					0,47	0,37	
<i>p-value</i>					0,0056	0,0343	

Los resultados del análisis de la varianza indican que el $\Delta P-PO_4$ ENZIMA sólo se ve afectado por la dosis y no por el P_T o el P_{org} disponible. Sin embargo, la eficacia sí que se ve afectada por esto dos últimos.

Tanto los resultados de la ANOVA como del estudio de las correlaciones indican que $\Delta P-PO_4$ ENZIMA es independiente del P_T . De este modo, es posible agrupar los experimentos realizados a una misma dosis con independencia del P_T del fango mezcla con el que se realizan los diferentes ensayos. Por tanto, se puede asumir que los diferentes ensayos se han realizado con fangos de características similares, al menos en lo referente al P_T y, por ende, al P_{org} disponible, componente sobre el que ha de actuar la enzima. De este modo se ha elaborado la Tabla 27 en las que se presentan los promedios y las desviaciones estándar de las características del fango y los resultados de liberación de $P-PO_4$ y eficacia obtenidos para cada una de las dosis enzimáticas evaluadas:

Tabla 27. Valores promedio y desviaciones estándar de los ensayos seleccionados, agrupados por dosis.

Reactor	Dosis	P_T	$P-PO_4$	P_{org} disponible	P_{org} hidrolizado	$\Delta P-PO_4$ ENZIMA	Eficacia
	g enz·kg ⁻¹ fango (b.h.)	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
R0.5	0,5	701	230	471	33	5	1,0
R1	1	726±141	202±31	524±122	28±4	12±14	2,4±2,9
R6	6	728±105	304±80	424±52	42±6	29±14	6,7±3,1
R15	15	809±26	372±27	437±1	46±1	34±11	7,6±2,4
R25	25	794±176	255±89	540±208	34±13	46±17	9,9±5,4
R50	50	812±177	265±89	547±219	34±14	39±16	7,8±4,1
R75	75	943±213	251±121	692±329	30±22	45±21	11,5±11,2

A partir de los datos recogidos en la Tabla 27 se ha representado la evolución de las variables de respuesta del proceso enzimático ($\Delta P-PO_4$ ENZIMA y Eficacia) frente a las dosis enzimáticas evaluadas, obteniéndose las representaciones gráficas que se presentan en la Figura 53 y la Figura 54, donde se incluyen también los ajustes realizados utilizando la **ecuación de Monod**.

Esta ecuación, ampliamente utilizado en microbiología y bioquímica, describe cómo una variable de respuesta se aproxima a un valor máximo a medida que aumenta la concentración de un factor limitante, en este caso, la dosis de enzima. Su forma general es:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (\text{Ec. 28})$$

donde:

- v : variable de respuesta.
- S : dosis o concentración del factor.
- $v_{\max}$: valor máximo de la respuesta.
- K_S : constante de semi-saturación, es decir, el valor de S al que se alcanza el 50% de $v_{\max}$.

Con esta ecuación se realizaron dos ajustes independientes, uno para cada variable respuesta:

$$1) \Delta P - PO_{4\text{ENZIMA}} = 45,69 \cdot \frac{\text{Dosis}}{3,37 + \text{Dosis}}$$

Este ajuste describe cómo la dosis de enzima ($\text{g enzima} \cdot \text{kg}^{-1}$ fango b.h.) afecta la cantidad de P liberado por acción de las enzimas añadidas al proceso, $\Delta P - PO_{4\text{ENZIMA}}$ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$). El parámetro $v_{\max}=45,69$ representa la liberación máxima teórica, y $K_S=3,37$ la dosis a la cual se alcanza la mitad de esa respuesta.

$$2) \%Eficacia = 10,41 \cdot \frac{\text{Dosis}}{3,78 + \text{Dosis}}$$

Este ajuste describe cómo la dosis de enzima ($\text{g enzima} \cdot \text{kg}^{-1}$ fango b.h.) influye sobre el porcentaje de eficacia del proceso. El parámetro $v_{\max}=10,41$ representa la eficacia máxima teórica, y $K_S=3,78$ indica la dosis a la que se alcanza el 50% de esa eficacia máxima.

Ambos modelos muestran un comportamiento típico de saturación, donde los incrementos iniciales en la dosis de enzima generan aumentos significativos en la respuesta, pero una vez superado cierto umbral, dichos incrementos tienen un efecto cada vez menor. Este comportamiento es coherente con la dinámica esperada de sistemas enzimáticos limitados por disponibilidad de sustrato o capacidad de acción.

En la Figura 53 se observa que la dosis de $25 \text{ g enzima} \cdot \text{kg}^{-1}$ fango (b.h.) representa el punto óptimo de aplicación, alcanzando la máxima liberación neta ($\Delta P - PO_{4\text{enzima}}$) ($46 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$). A partir de esta dosis,

el incremento en la cantidad de enzima no se traduce en una mejora proporcional en la liberación de P, lo que sugiere que el proceso comienza a saturarse en torno a una concentración de P-PO₄ de 46 mg P·L⁻¹. Esto implica que trabajar con dosis superiores a 25 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h.) no resulta eficiente, ya que no aporta mejoras significativas y conlleva un mayor consumo de reactivo sin beneficios adicionales. Por el contrario, dosis inferiores a 25 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h.) muestran una disminución clara en la liberación de P-PO₄, lo que indica que no se alcanza el umbral enzimático necesario para una hidrólisis efectiva del P orgánico.

En conjunto, estos resultados refuerzan que R25 constituye una dosis óptima, tanto desde el punto de vista técnico como, a priori, económico, ya que permite maximizar la liberación de P sin incurrir en un uso innecesario de enzima.

Por su parte, la evolución de la eficacia frente a la dosis enzimática (Figura 54) muestra un comportamiento muy similar al observado en la liberación neta de P-PO₄. Aunque la dosis de 50 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h.) presenta el valor más alto de eficacia (11,5%), este apenas supera al valor obtenido con la dosis de 25 g enzima·kg⁻¹ fango, que alcanza una eficacia del 9,9%. Además, a dosis inferiores a R25 la eficacia cae notablemente, mientras que a dosis superiores no se observan mejoras proporcionales, lo que sugiere una saturación del proceso enzimático también desde el punto de vista de la eficiencia.

Dado que la diferencia entre ambos valores es reducida, y considerando que R25 también proporciona la mayor liberación neta de P-PO₄, se corrobora la idea de que 25 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h.) constituye la dosis óptima, al ofrecer un buen equilibrio entre eficacia y rendimiento, evitando un consumo innecesario de enzima. **Por tanto, R25 se consolida como la mejor opción tanto técnica como económica para maximizar la acción de la fitasa.**

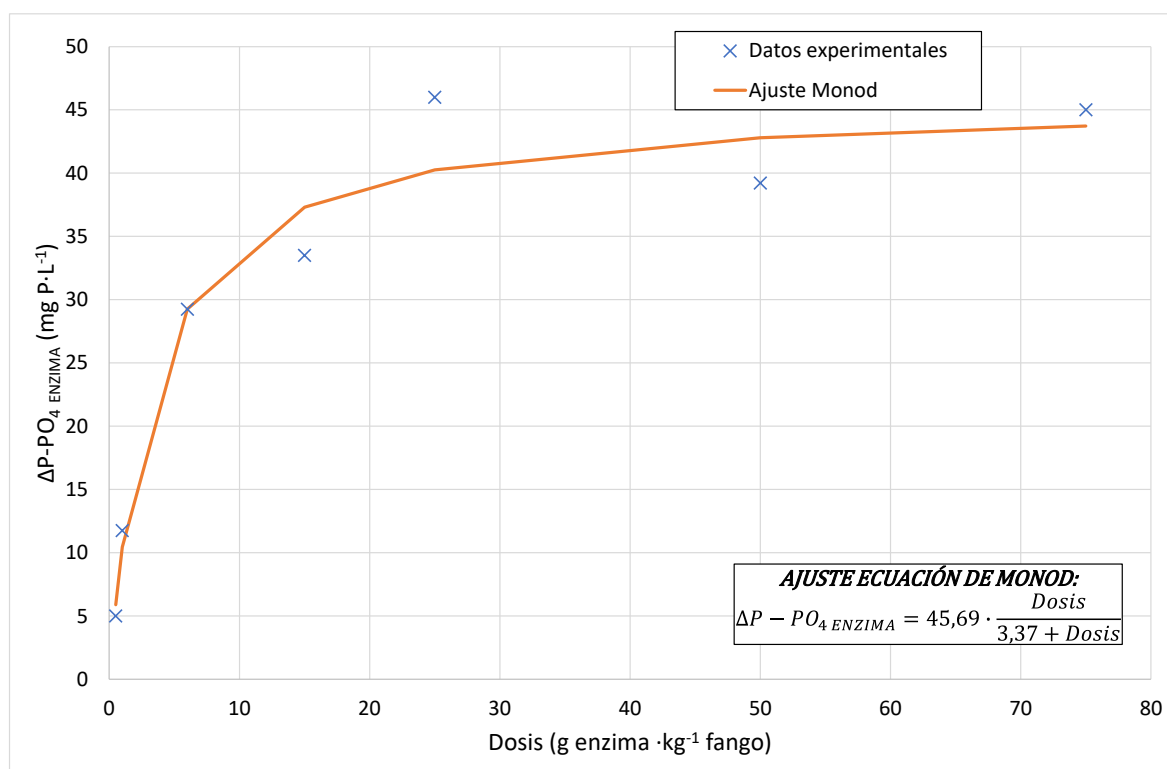


Figura 53. Representación de los resultados promedio de liberación neta de $P-PO_4$ frente a las dosis enzimáticas evaluadas.

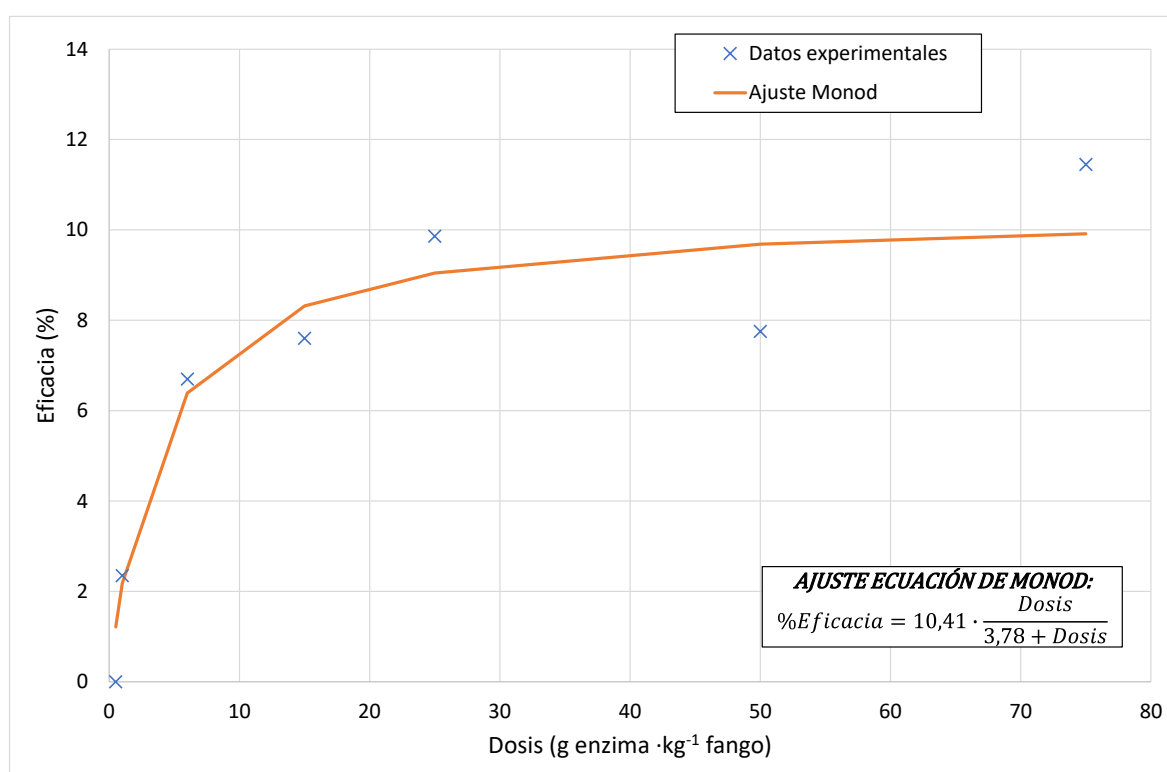


Figura 54. Representación de los resultados promedio de porcentajes de eficacia de liberación frente a las dosis enzimáticas evaluadas.

4.1.5.1. ESTUDIO DEL POTENCIAL DE BIOMETANIZACIÓN TRAS ENSAYO ENZIMÁTICO

Con el objetivo de evaluar la biodegradabilidad anaerobia de las enzimas utilizadas y su posible contribución a la producción de biogás, se llevaron a cabo ensayos BMP. Para ello, se empleó el contenido final de los reactores R25 y R50 correspondientes al ensayo enzimático M7.

Este análisis perseguía un doble propósito:

1. Determinar si la **adición de enzimas inducía una sinergia positiva** en la biodegradación anaerobia del fango mezcla, mejorando así su conversión a metano.
2. Evaluar si la **materia orgánica contenida en las propias enzimas** podía ser aprovechada anaeróbicamente, contribuyendo de forma directa a la generación de biogás.

La metodología seguida para estos ensayos se describe detalladamente en el apartado 3.8. En la Figura 55 y en la Figura 56 se presentan las producciones acumuladas de metano obtenidas durante los ensayos BMP.

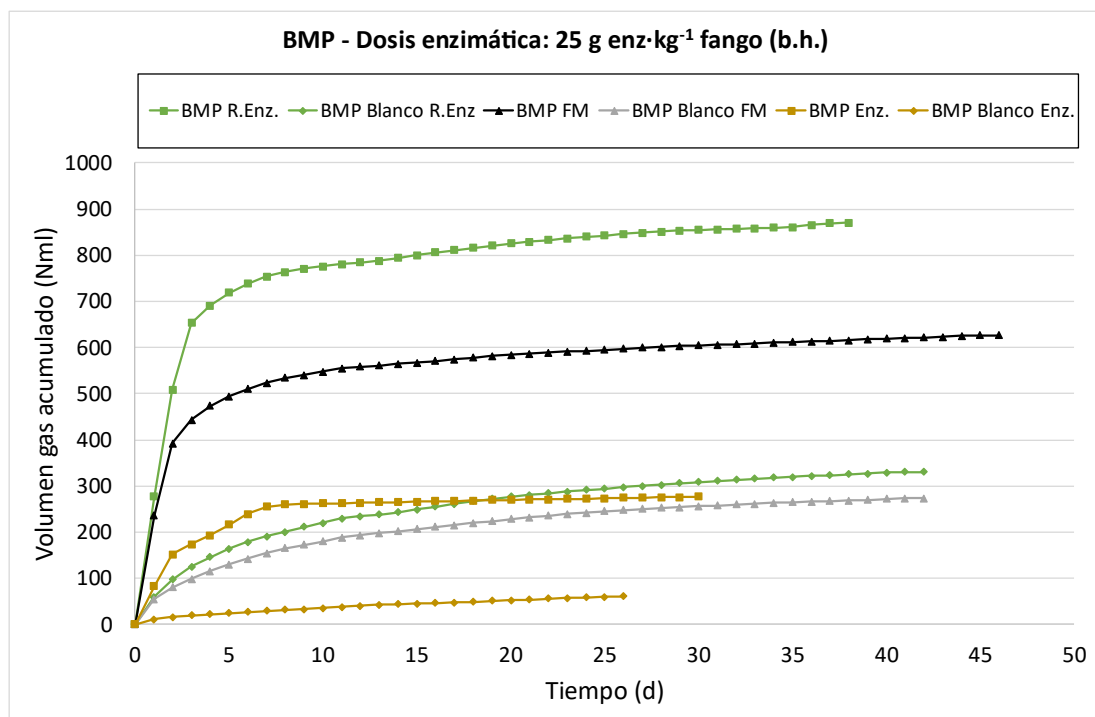


Figura 55. Producción acumulada de metano en los ensayos BMP para la dosis de 25 g enz·kg⁻¹fango (b.h.).

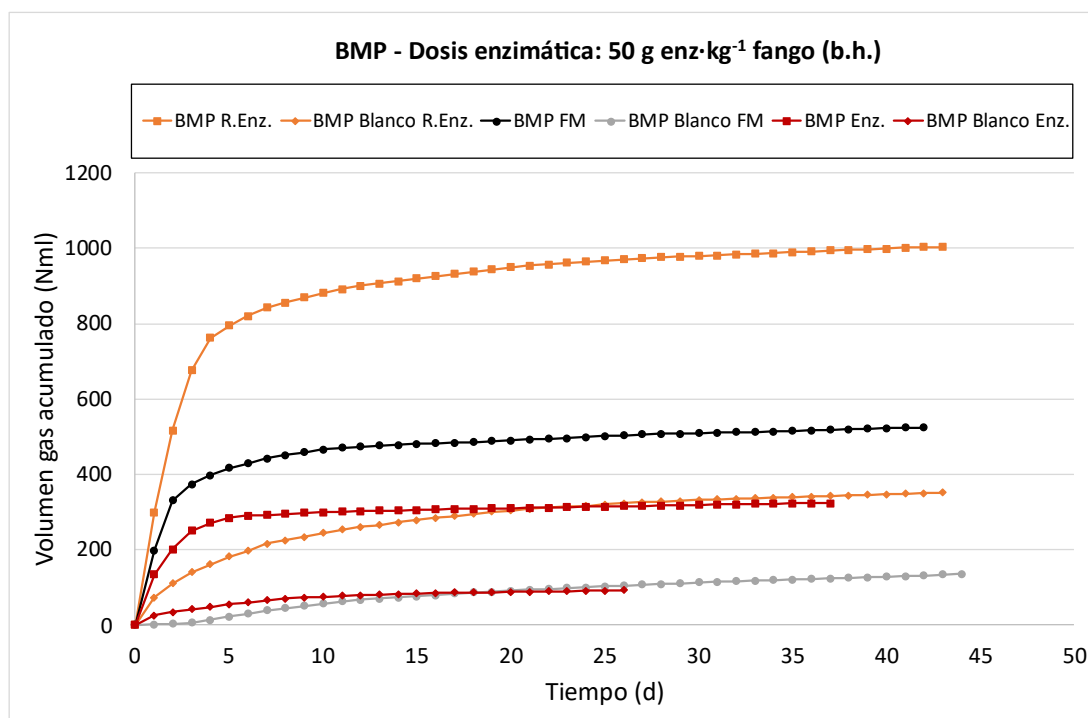


Figura 56. Producción acumulada de metano en los ensayos BMP para la dosis de 50 g enz·kg⁻¹fango (b.h.).

En estas se aprecia que los reactores BMP R.Enz. del ensayo M7 generaron volúmenes de metano superiores a los observados en los reactores BMP FM. Asimismo, se observa una notable producción de metano en los reactores R.Enz, lo cual resulta coherente con la elevada demanda química de oxígeno (DQO) asociada a la enzima utilizada.

La Figura 55 y la Figura 56 también incluyen los reactores blancos correspondientes a cada condición evaluada, es decir, aquellos que proporcionan la producción de metano atribuible exclusivamente al inóculo (fango anaerobio procedente de la EDAR de Calahorra).

A continuación, en la Tabla 28 y Tabla 29 se presentan los resultados detallados de los ensayos, incluyendo los volúmenes acumulados de metano medidos y las producciones netas experimentales, calculadas tras descontar la contribución del inóculo.

Además, en estas tablas se incluyen las producciones de metano estimadas a partir de los datos experimentales, con el fin de verificar si el tratamiento enzimático aplicado al fango mejora su

biodegradabilidad. Para ello, se consideró que la producción total de metano en el reactor enzimático (R.Enz.) debería ser la suma del metano generado por el fango mezcla (FM) y por las enzimas (Enz.) (como aporte adicional de sustrato biodegradable). De forma inversa, también se calculó la producción de metano correspondiente únicamente al fango mezcla (FM), descontando a R.Enz. la contribución del control enzimático (Enz.). Esta comparación permite confirmar si el tratamiento enzimático aumenta la solubilización de materia orgánica y, en consecuencia, favorece una mayor generación de metano.

Tabla 28. Producciones de metano acumuladas en los ensayos BMP (experimentales y teóricas) correspondientes a la dosis R25.

Reactores	Volumen gas acumulado
	mL
BMP FM	626,9
BMP Blanco FM	273,2
Producción de metano_{experimental} (FM)	353,7
BMP R.Enz.	870,3
BMP Blanco R.Enz	330,9
Producción de metano_{experimental} (R.Enz.)	539,4
BMP Enz.	276,4
BMP Blanco Enz.	61,3
Producción de metano_{experimental} (Enz.)	215,1
Producción de metano neta_{estimada} (FM)	324,3
Producción de metano neta_{estimada} (R.Enz.)	568,8

Tabla 29. Producciones de metano acumuladas en los ensayos BMP (experimentales y teóricas) correspondientes a la dosis R50.

Reactores	Volumen gas acumulado
	mL
BMP FM	524,0
BMP Blanco FM	135,9
Producción de metano_{experimental} (FM)	388,1
BMP R.Enz.	1.003,4
BMP Blanco R.Enz	350,8
Producción de metano_{experimental} (R.Enz.)	652,6
BMP Enz.	324,0
BMP Blanco Enz.	91,9
Producción de metano_{experimental} (Enz.)	232,1
Producción de metano_{estimada} (FM)	420,5
Producción de metano_{estimada} (R.Enz.)	620,2

En ambos casos (ver Tabla 28 y Tabla 29), se observa una buena correspondencia entre las producciones experimentales y las estimadas calculadas, lo cual indica que el incremento observado en la producción de metano de BMP R.Enz. con respecto a BMP FM, se debe a la DQO aportada por la dosis de enzima introducida en cada reactor. Por tanto, la introducción de la enzima no genera una mejora en la biodegradabilidad anaerobia del fango mezcla y, por tanto, en la producción de metano a partir de este sustrato. No obstante, el incremento en la producción de metano tras la adición de la enzima será un aspecto a valorar en el estudio de viabilidad económica del proyecto, para evaluar si la valorización energética de este metano derivado de la enzima compensa parcialmente los costes de aplicación de la misma.

4.1.6. COMPARATIVA INTEREXPERIMENTAL EN FUNCIÓN DEL SUSTRATO ENSAYADO: FANGO SECUNDARIO Y FANGO MEZCLA

En este apartado se realiza un análisis comparativo de los resultados obtenidos para el fango secundario (Lote “S”) y el fango mezcla entre (Lote “M”), teniendo en cuenta los resultados de liberación neta de $P-PO_4$ tras 22 horas a 35°C. Para el lote “S” se consideraron los ensayos S6, S7 (ver Tabla 21) y para el lote “M” los ensayos M1, M2, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10 y M13 (ver Tabla 25). En esta comparativa se han excluido, al igual que en el análisis estadístico, los ensayos M3 y M11, por los motivos anteriormente expuestos. Con el fin de asegurar una comparación homogénea entre ambos lotes, el análisis se centra únicamente en los reactores con dosis enzimáticas R25, R50 y R75.

A la vista de los resultados en estos ensayos, se puede concluir que la liberación de $P-PO_4$ por acción de la fitasa varía significativamente en función del tipo de sustrato utilizado. Se observa que el uso de fango mezcla (lote M) presenta, en general, una mayor capacidad de liberación neta de P en comparación con el fango secundario (lote S). Aunque en el lote M se registraron algunos valores bajos ($1-2 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$), estos pueden considerarse valores atípicos, posiblemente asociados a variaciones puntuales en la composición del fango o a condiciones puntuales desfavorables para la actividad enzimática. Si se excluyen estos valores extremos, el resto de los resultados del lote M muestra concentraciones de $P-PO_4$ más frecuentes entre $41 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $62 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, frente a las observadas en el lote S ($26,3 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $47,0 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que indica una liberación efectiva de P por parte del fango mezcla. Esta mayor liberación prácticamente no se observa en las dosis R0,5 y R1, donde la cantidad de enzima fue insuficiente para inducir una actividad apreciable sobre el fango mezcla.

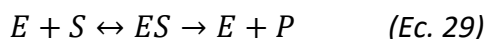
Por tanto, y considerando la necesidad de maximizar la recuperación del P, el uso de fango mezcla se perfila como una opción más favorable frente al fango secundario ya que ofrece un mayor potencial en términos de recuperación de P, siempre que se logre una buena elutriación y posterior cristalización del PO_4 liberado.

Sin embargo, al analizar los porcentajes de eficacia de liberación (ver Tabla 21 y Tabla 25) se observa que son más altos en el lote de ensayos “S” (entre 26,6% y 40,9%) frente a los registrados en el lote “M” (<10%). Esta diferencia no implica necesariamente un mejor comportamiento del fango secundario como sustrato, sino que está directamente relacionada con su menor concentración de ST. En el caso del fango mezcla, compuesto por aproximadamente un 45 % de fango primario espesado y un 55 % de fango secundario también espesado, la carga de P orgánico en el sistema es considerablemente mayor. Por el contrario, el fango secundario utilizado no estaba espesado, por lo que presenta una matriz mucho más diluida. Así, al calcularse las dosis de enzima aplicadas en base húmeda, es decir, por kg de fango empleado en el ensayo, se genera una diferencia importante en la carga enzimática por unidad de ST. Esto se debe a que la cantidad de enzima aplicada fue la misma para ambos tipos de fango, pero considerando que el fango secundario tiene un contenido promedio de sólidos totales del 0,5 %, mientras que el fango mezcla tiene un 4 %, la cantidad de enzima añadida para tratar un kilo de fango mezcla en base seca (b.s.) es aproximadamente ocho veces menor que la necesaria para tratar un kilo de fango secundario en base seca, debido a la menor concentración de sólidos en este último. Así, la mayor relación enzima/ST en el fango secundario favorece la eficacia de la reacción, ya que una mayor disponibilidad de enzima por unidad de sustrato incrementa la probabilidad de interacción de la enzima con el P orgánico, mejorando así el rendimiento relativo de la hidrólisis enzimática. Es decir, la mayor eficacia observada en el fango secundario puede estar asociada a la sobredosificación relativa de enzima al tratarse de un fango más diluido. En este sentido, el uso de enzima sobre fango mezcla resulta más eficiente desde el punto de vista económico y técnico, ya que permite tratar una mayor carga de sólidos con menor cantidad de enzima, siempre que se logren niveles de liberación (eficacia) comparables a los alcanzados en el lote “S” de ensayos.

Por otro lado, al analizar la respuesta del sistema frente al aumento de la dosis enzimática, se observa que incrementar la cantidad de enzima de R25 a R50 o R75 no mejora de forma significativa la liberación neta de P-PO₄, ni en el lote M (ver Figura 53) ni en el lote S. Esto sugiere que, más allá de cierto umbral, añadir más enzima no supone una mejora del rendimiento, lo que podría estar relacionado con fenómenos de inhibición competitiva (de Arriaga, 1979). En este tipo de inhibición, la enzima (E, fitasas) se asocia reversiblemente al sustrato (S, ácido fítico) o al inhibidor (I). Los posibles inhibidores competitivos en este caso serían: 1) el propio producto de la hidrólisis, es decir,

el P-PO₄, que podría unirse reversiblemente al centro activo de la enzima, compitiendo con el ácido fítico; 2) iones metálicos como Ca, Fe, Mg, que pueden formar complejos con el ácido fítico, reduciendo su biodisponibilidad y, por tanto, la eficacia de la hidrólisis enzimática.

La mecánica de la inhibición competitiva se representa mediante las ecuaciones (Ec. 29) y (Ec. 30):



Esta ecuación describe la vía catalítica normal: la enzima (E) se une reversiblemente al sustrato (S), formando un complejo enzima-sustrato (ES), que posteriormente da lugar al producto (P) y libera nuevamente la enzima.



En condiciones de inhibición competitiva, el inhibidor (I) se une de manera reversible al mismo sitio activo que el sustrato, formando un complejo enzima-inhibidor (EI) que no da lugar a producto, bloqueando temporalmente la actividad enzimática.

El efecto inhibidor dependerá de las concentraciones relativas de sustrato e inhibidor y de sus respectivas afinidades por la enzima. En consecuencia, si se acumula producto (P-PO₄) o si existen especies que interfieren con la accesibilidad del ácido fítico, la eficiencia del sistema puede verse limitada incluso ante aumentos en la dosis de enzima.

En resumen, aunque los porcentajes de eficacia sean superiores para el fango secundario, es el fango mezcla el que ofrece mayores concentraciones de PO₄ liberadas (compuesto de interés para su extracción y posterior recuperación). Esto se debe a que el fango mezcla parte de un contenido inicial significativamente mayor de P orgánico, lo que proporciona un mayor potencial de liberación. Además, esta característica se acompaña de un menor ratio enzima/sustrato en base seca, lo que supone una ventaja adicional: el sistema requiere una menor carga enzimática relativa para liberar una mayor cantidad de P. Es decir, se optimiza el uso de la enzima, aumentando la eficiencia del proceso.

Por tanto, desde una perspectiva técnica y económica, el uso de fango mezcla se consolida como la alternativa más ventajosa, al permitir el tratamiento de mayores cantidades de P total con un menor consumo de enzima.

Finalmente, cabe resaltar el efecto sinérgico asociado al uso de fango mezcla como sustrato. En los experimentos del lote “M” se ha observado que la hidrólisis inducida por la adición de enzima no solo promueve la liberación de $P-PO_4$, sino que también parece estimular la actividad de las bacterias acidogénicas, presentes en mayor proporción en el fango primario, lo que se traduce en una acumulación de AGV en el medio. Así, la acción de las enzimas fitasas no solo actúa directamente sobre el P orgánico, sino que favorece indirectamente la actividad microbiana, promoviendo rutas metabólicas que refuerzan el proceso de hidrólisis y contribuyen a una mayor solubilización de compuestos orgánicos.

4.1.7. LOTE DE ENSAYOS “C”: ENZIMAS CELULOLÍTICAS APLICADAS SOBRE FANGO MEZCLA

Los ensayos realizados en este lote (ensayos lote “C”) tuvieron como objetivo principal la cuantificación de la liberación de $P-PO_4$ al medio, resultado de la actividad de enzimas hidrolíticas del tipo celulolíticas aplicadas sobre fango mezcla procedente de la EDAR de Calahorra. El **estudio** con estas enzimas se hizo **sobre fango mezcla** en base a los resultados obtenidos para este fango con las enzimas fitasas (liberaciones netas similares, menor cantidad de enzima a añadir y la corriente a tratar debe elevarse a 35°C antes de entrar al digestor).

En las tablas Tabla 30 y Tabla 31 se detallan los resultados obtenidos de las caracterizaciones físico-químicas realizadas sobre las enzimas (celulolíticas) y el sustrato (fango mezcla) empleados en este lote de ensayos.

Con respecto al fango mezcla, las características físico-químicas analizadas son similares a las observadas en el apartado 4.1.5 (ver Tabla 23). En ambos casos, se observa una concentración de P_T intermedia, con respecto a los resultados obtenidos en el lote “M” de ensayos. En el caso de las enzimas celulolíticas, las características a destacar son las elevadas concentraciones de $N-NH_4$ y $P-PO_4$ que presenta, de magnitudes similares a las observadas en las enzimas fitasa (ver Tabla 24).

Se realizaron un total de **dos ensayos**, manteniendo las condiciones operacionales utilizadas en el lote de ensayos “M”, es decir: **35°C y 22 horas de duración experimental**, parámetros con los que se consiguieron las mayores liberaciones netas de $P-PO_4$ por acción enzimática (ver apartados 4.1.4 y 4.1.5).

En el primero de estos (**C1**) se realizó un **ajuste del pH** cada dos horas en los reactores con adición enzimática, durante las primeras 6 horas de ensayo. Esto se hizo para proporcionar a las enzimas celulolíticas las condiciones de pH óptimas según el fabricante (3,5 - 5,5, ver Tabla 6). En el segundo ensayo (**C2**) **no se realizó ajuste de pH** para comparar los resultados de liberación de $P-PO_4$ frente a ajustar el pH del sistema (C1).

Tabla 30. Caracterización físico-química del sustrato fango mezcla utilizado en el lote de ensayos "C".

Ensayos	DQO_T	ST	SV	SV	SST	$\%SST$	SSV	$\%SSV$	AGV	$N-NH_4$	$P-PO_4$	N_T	P_T	pH
	$mg \cdot L^{-11}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	-
C1	69100	41971	30861	73,5%	38915	92,7%	29195	75,0%	2600	183	175	2200	655	5,3
C2	66000	36413	29758	81,7%	34645	95,1%	28440	82,1%	2546	229	309	2150	777	5,4
PROMEDIO	67550	39192	30310	77,6%	36780	93,9%	28818	78,6%	2573	206	242	2175	716	5,4
DESV	2192	3930	780	5,8%	3019	1,7%	534	5,0%	38	33	95	35	86	0,1

Tabla 31. Caracterización físico-química de las enzimas celulolíticas utilizadas en el lote de ensayos "C".

Ensayos	DQO_T	ST	SV	SV	SST	$\%SST$	SSV	$\%SSV$	AGV	$N-NH_4$	$P-PO_4$	N_T	P_T	pH
	$mg \cdot L^{-11}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	%	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	$mg \cdot L^{-1}$	-
C1	379000	220680	158175	71,7%	35040	15,9%	25930	74,0%	342	669	1550	N/A	N/A	4,9
C2	413000	418728	287338	68,6%	37270	8,9%	26860	72,1%	357	651	1555	N/A	N/A	5,0
PROMEDIO	396000	319704	222757	70,1%	36155	12,4%	26395	73,0%	350	660	1553	-	-	5,0
DESV	24042	140041	91332	2,2%	1577	4,9%	658	1,4%	11	13	4	-	-	0,1

En el ensayo C1 (ver Figura 57), se pusieron en marcha los reactores R0, R25 y R50, ya que fueron estas dosis intermedias las que resultaron más efectivas en el anterior lote de ensayos (lote M).

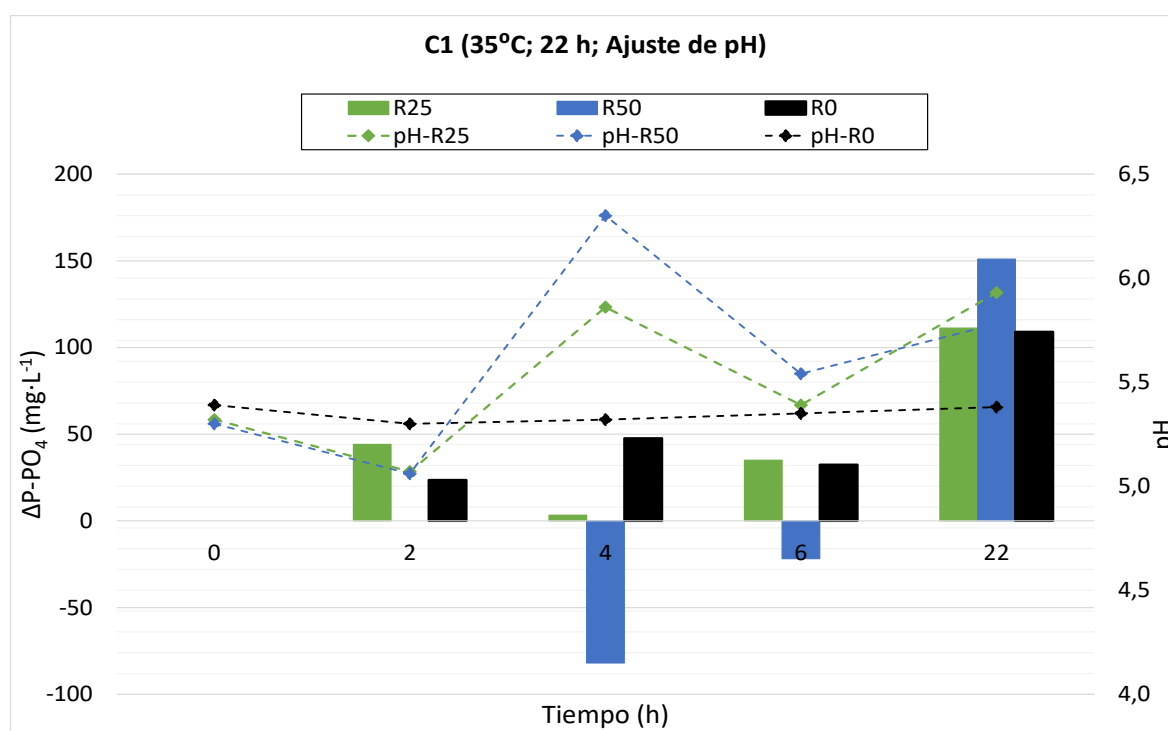


Figura 57. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "C1".

Durante las primeras 6 horas de ensayo, en R0 se observaron liberaciones acumuladas de P-PO₄ que oscilaron entre 23,6 mg P·L⁻¹ y 47,6 mg P·L⁻¹. En los reactores con adición de enzima, entre las 2 y las 6 horas de ensayo se observó variabilidad en las liberaciones y/o pérdidas acumuladas de P-PO₄, al igual que lo observado en los ensayos del lote "M". Tras las 22 horas de ensayo, en el reactor R0 se observó una liberación acumulada de P-PO₄ de 109,1 mg P·L⁻¹, como resultado de la acción de las bacterias acidogénicas presentes en el fango. Este valor coincide prácticamente con la liberación acumulada a las 22 horas en el reactor R25 (111,2 mg P·L⁻¹). Esto indica que, en este caso, esta dosis enzimática no contribuyó a la hidrólisis del P orgánico presente en las paredes celulares de las bacterias que conforman el fango mezcla. En el reactor R50, concluidas las 22 horas de ensayo, se obtuvo una liberación acumulada de P-PO₄ de 151,0 mg P·L⁻¹, superior a la observada en R0 y atribuida tanto a la acción de las bacterias acidogénicas presentes en el fango como a la acción hidrolítica de las enzimas celulolíticas añadidas.

En cuanto a la evolución del pH, en R0 se observó la misma tendencia que en los ensayos correspondiente al lote M: una progresión del pH bastante estable, que se mantuvo entre valores de 5,3 y 5,4. La evolución del pH en los reactores con adición enzimática refleja tanto los ajustes manuales de pH realizados durante las primeras horas, como los cambios provocados por la propia actividad biológica y enzimática en el sistema. Al inicio del ensayo (0h), ambos reactores (R25 y R50) comienzan con un pH similar, ligeramente por encima del intervalo óptimo de acción para la enzima Viscozyme® L (ideal entre 3,5 y 5,5). A las 2 horas, el pH se ajusta mediante adición de NaOH, lo que debía colocarlo dentro del rango óptimo. Sin embargo, debido al método de ajuste manual (gota a gota), se produjo un exceso en algunos casos, especialmente a las 4 horas, donde el pH alcanzó valores de 5,9 en R25 y 6,3 en R50. Esto indica un sobreajuste que pudo desplazar el pH fuera del intervalo óptimo de acción enzimática, afectando momentáneamente su actividad. A las 6 horas, el pH se vuelve a ajustar, alcanzándose valores de 5,4 en R25 y de 5,5 en R50. Finalmente, tras 22 horas, el pH tiende a subir ligeramente, situándose en 5,9 para R25 y en 5,8 para R50.

En el caso del ensayo C2 (ver Figura 58), se pusieron en marcha los reactores R0, R25 y R50, añadiéndose el reactor R0+Hac como control para comprobar que no existía liberación de poly-P acumulado en el interior de las bacterias PAO, presentes en el fango mezcla. Así mismo, se probó también con el reactor R75, es decir, se incrementó la dosis a ensayar en vista de que la dosis R25 no demostró tener ningún efecto en el ensayo C1 y podría ser necesario evaluar una dosis mayor.

Durante las primeras 6 horas, tanto para los reactores control (R0 y R0+Hac) como para los reactores con adición de enzima fitasa, se observaron liberaciones acumuladas de P-PO₄ que oscilaron entre 35 mg P·L⁻¹ y 150,6 mg P·L⁻¹.

Las liberaciones acumuladas de P-PO₄ a las 22 horas en los reactores R0 y R0+Hac registraron valores similares entre sí, entre 149,2 mg P·L⁻¹ y 151,2 mg P·L⁻¹. Los resultados obtenidos en R0+Hac indicaron que no existió liberación extra del Poly-P almacenado intracelularmente en las bacterias PAO, a pesar de proporcionar una elevada concentración de AGV al medio.

Las liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ a las 22 horas en los reactores con adición de enzima se deben a la acción conjunta de la hidrólisis llevada a cabo por las bacterias acidogénicas y las enzimas celulolíticas. En el ensayo C2, se alcanzaron liberaciones de $151,3 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R25, $184,6 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R50 y $190,2 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R75. Así, destaca el hecho de que en R25, el valor de liberación acumulada de $P-PO_4$ obtenido es prácticamente igual al de R0.

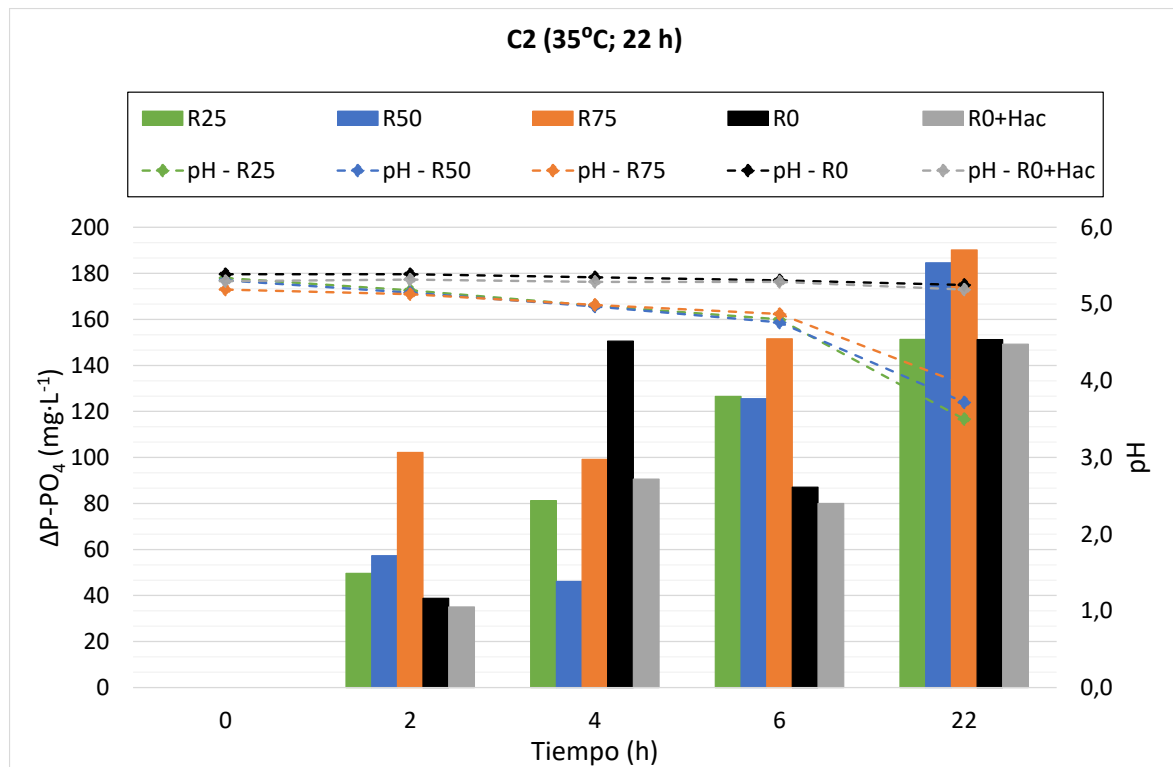


Figura 58. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en los reactores puesto en marcha en el ensayo "C2".

En cuanto al pH, esta vez sin control, se observó una evolución de pH similar a la observada en el lote de ensayos "M". Es decir, en los reactores que no tienen adición de enzima el pH se mantuvo relativamente estable en el tiempo. En contraste, en los reactores R25, R50 y R75, se evidenció una disminución gradual del pH, especialmente pronunciada entre las 8 y las 22 horas. Esta caída se relaciona con la acumulación de AGV en el medio, resultado de la hidrólisis acidogénica promovida por la acción de las enzimas celulolíticas.

La Tabla 32 recoge los principales parámetros utilizados para evaluar la eficacia de la liberación de P inducida por la acción de las enzimas celulolíticas en los ensayos del Lote C-C1 y C2. Incluye valores iniciales del fango, cálculos de P orgánico y resultados de $\Delta P-PO_4$ ENZIMA y eficacia del proceso.

Tabla 32. Ensayos correspondientes al lote "C" realizados a temperatura de operación 35°C y tiempo experimental 22 horas.

Ensayos	Reactor	P_T	$P-PO_4$	P_{org} disponible	P_{org} hidrolizado	$\Delta P-PO_4$ ENZIMA	Eficacia
		mg $P \cdot L^{-1}$	mg $P \cdot L^{-1}$	mg $P \cdot L^{-1}$	%	mg $P \cdot L^{-1}$	%
C1	R25	655	174,6	480	27	2,2	0,4
	R50					41,9	8,7
C2	R25	777	308,6	468	40	0,1	0
	R50					33,3	7,1
	R75					38,9	8,3

En el ensayo C1, donde se aplicó un ajuste de pH, la mayor liberación neta de $P-PO_4$ se produjo en el reactor R50 (41,9 mg $P \cdot L^{-1}$), mientras que en R25 prácticamente no se observó efecto hidrolítico por parte de las enzimas celulolíticas (2,2 mg $P \cdot L^{-1}$). Esto sugiere que, en este caso, la dosis de 25 g enzima $\cdot kg^{-1}$ fango no promovió la acción de las enzimas aplicadas.

En el ensayo C2 la mayor liberación neta de $P-PO_4$ se observó en R75 (38,9 mg $P \cdot L^{-1}$), seguido muy de cerca por R50 (33,3 mg $P \cdot L^{-1}$). En R25, al igual que en el ensayo C1 no se observó actividad por parte de las enzimas celulolíticas aplicadas (0,1 mg $P \cdot L^{-1}$). Así, aunque la dosis más alta (R75) obtuvo la mayor liberación neta de $P-PO_4$, en R50 se alcanzó un valor similar, combinando una liberación significativa con un menor consumo de enzima.

Analizando los porcentajes de eficacia de liberación de $P-PO_4$, el ensayo C1, R50 presentó el mejor resultado (8,7%), mientras que con R25 se obtuvo un valor de eficacia del proceso prácticamente insignificante (0,4%). En C2, aunque R75 fue más efectivo (8,3% frente a 7,1% en R50), la mejora no justifica el mayor consumo enzimático. En conjunto, los resultados evidencian que R50 representa una opción equilibrada, con buena eficacia de liberación de $P-PO_4$ y un uso más racional de enzima, posicionándose como la dosis más recomendable en condiciones similares.

4.1.8. COMPARATIVA ENTRE ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y FITASAS

Con el objetivo de analizar las diferencias en el comportamiento del proceso en función del tipo de enzima aplicada (celulolíticas o fitasas) se han comparado los resultados obtenidos en el lote “C” con los del Grupo 2 del lote “M”. Esta comparación resulta adecuada ya que tanto en los ensayos del lote “C” como en el Grupo 2-Lote “M” se utilizó fango mezcla sobre con valores similares de P_T .

Para esta comparación, cabe resaltar que la EDAR de Calahorra recibe aguas residuales de origen industrial, principalmente conservero, lo que implica una elevada presencia de restos vegetales (granos, cereales y fibras no digeridas), los cuales representan una fuente importante de P orgánico atrapado en las paredes celulares de estos residuos. En este contexto, el objetivo del tratamiento con enzimas celulolíticas es romper las estructuras de celulosa y hemicelulosa de esos restos vegetales, facilitando la liberación del P orgánico contenido en su interior hacia el medio líquido.

Al comparar los resultados del lote “C” (ensayos C1 y C2) con los del Grupo 2 del lote “M”, se observa que en el lote “C”, las liberaciones netas de $P-PO_4$ solo fueron significativas a dosis R50 (entre 33,3 mg $P \cdot L^{-1}$ y 41,9 mg $P \cdot L^{-1}$), ya que con R25 el efecto fue prácticamente nulo (liberaciones netas entre 0,1 mg $P \cdot L^{-1}$ y 2,2 mg $P \cdot L^{-1}$). Por tanto, los mejores resultados en cuanto a liberación se obtienen a costa de una mayor dosis enzimática. En cambio, el lote “M” permitió alcanzar mayores liberaciones netas con dosis R25, aunque con mayor variabilidad (liberaciones netas desde 13 mg $P \cdot L^{-1}$ hasta 77 mg $P \cdot L^{-1}$), probablemente asociada a la heterogeneidad en el contenido de ácido fítico entre las réplicas. Esto indica que la acción de las enzimas celulolíticas sobre los restos vegetales presentes en el fango (como fragmentos de granos o fibras no digeridas) permite liberar P orgánico que

previamente permanecía inaccesible, aunque requiere una mayor dosis enzimática (R50) para ser efectiva. En cambio, las fitasas demostraron alcanzar su mayor efectividad con la dosis menor (R25) (ver apartado 4.1.6), lo que las posiciona como una alternativa más eficiente en términos de relación dosis-efecto, con un mayor potencial de aplicación en sistemas reales de tratamiento y recuperación de P.

4.1.9. LOTE DE ENSAYOS “I”: ENSAYOS CON ENZIMAS FITASA ENCAPSULADAS

Como continuación del estudio llevado a cabo hasta este punto con la aplicación de enzimas en forma libre, se abordó la inmovilización de fitasas como una estrategia orientada a mejorar la viabilidad técnica y económica del proceso de liberación de P a partir del fango mezcla, identificado previamente como el sustrato más adecuado (ver apartado 4.1.6). Para estos ensayos, se optó por el uso de las enzimas fitasas, tras el análisis de resultados realizado en el apartado 4.1.8. Tras identificar dosis óptimas de aplicación de enzimas libres en los distintos ensayos previos, se consideró pertinente explorar métodos que permitieran su reutilización y una mayor estabilidad operativa, con el fin de optimizar el uso de enzimas.

Esta nueva línea de trabajo se vio reforzada por un análisis preliminar de viabilidad económica, aunque su desarrollo completo se presenta en un apartado posterior (4.3), que ya anticipaba las limitaciones del uso de enzimas en forma libre. En dicho estudio, los escenarios con aplicación directa de enzima resultaron claramente no viables bajo las condiciones económicas actuales. El elevado coste de la enzima suponía un obstáculo importante, ya que, pese a mejorar la producción de estruvita, no compensaba el impacto económico del proceso. Así, la exploración de la inmovilización enzimática surgió como una alternativa prometedora para reducir costes mediante la reutilización del biocatalizador y mejorar la eficiencia global del proceso.

El objetivo de encapsular las fitasas fue doble:

- Por un lado, **comparar la liberación de $P-PO_4$** obtenida con enzimas inmovilizadas frente a la aplicación convencional de enzimas libres;
-

- Por otro, **evaluar el comportamiento de las fitasas inmovilizadas durante varios ciclos de uso**, con el fin de determinar su estabilidad y su potencial para disminuir la necesidad de añadir enzima fresca en cada operación.

Esta estrategia busca reducir la cantidad total de enzima requerida para liberar el ácido fítico presente en el sustrato (fango mezcla), lo que permitiría mejorar la eficiencia general del proceso y reducir los costes asociados a la producción, manipulación y dosificación de enzimas.

Para la inmovilización de las enzimas fitasa se emplearon tres métodos de encapsulación distintos: (1) encapsulación mediante sol-gel, (2) encapsulación por spray drying y (3) polimerización en masa. Estas técnicas se seleccionaron por su potencial para proteger la actividad enzimática y permitir su reutilización en múltiples ciclos. La evaluación de las distintas disoluciones utilizadas para encapsular se orientó a determinar cuál de ellas permitía conservar mejor la actividad enzimática, promoviendo la liberación de $P-PO_4$, y facilitaba una mayor reutilización de la enzima encapsulada en ciclos sucesivos de aplicación, lo que constituye un aspecto clave para la viabilidad técnica y económica del proceso.

En el caso del método **sol-gel**, se elaboraron un total de **cuatro productos encapsulados**. Dos de ellos fueron formulaciones en forma de PASTILLAS, en las que se encapsuló la dosis R25 de enzima, seleccionada por haber mostrado en ensayos previos (lote “S” y lote “M”) un buen equilibrio entre eficacia-cantidad de P liberado y cantidad de enzima utilizada (relacionada directamente con el coste del proceso), sin que incrementos de dosis aportaran mejoras sustanciales. El secado de estos dos primeros productos se realizó por convección natural, lo que permitió mantener su estructura sólida. Las otras dos formulaciones, también con dosis R25 encapsulada, se realizaron con un secado forzado a 120°C durante 8 horas lo que dio lugar a la formación de un aerogel. Las encapsulaciones se realizaron utilizando distintas disoluciones de CS:TEOS (ver 3.9.1) con el fin de comparar su comportamiento en términos de estabilidad, actividad enzimática y reutilización.

Por otro lado, el método de **spray drying** permitió generar cápsulas en polvo mediante secado por atomización. Se llevaron a cabo un total de cinco encapsulaciones: cuatro con dosis R50, elegida por

representar un nivel intermedio con potencial para lograr una liberación significativa de P, y una última encapsulación con dosis R25, para comparar su rendimiento frente a las anteriores. Esta elección se basó en que, a diferencia del método sol-gel, el proceso de spray drying implica condiciones más agresivas (especialmente térmicas que podrían afectar la actividad de la enzima encapsulada). Por ello, se priorizó el uso de una dosis mayor (R50) con el objetivo de compensar posibles pérdidas de actividad durante el secado. La inclusión de una única prueba con R25 se justificó como control comparativo, dado que esta dosis había mostrado buen desempeño en los ensayos previos con *sol-gel*. En este caso también se emplearon diferentes combinaciones de agentes encapsulantes TEOS:CS y APTES:CS, cuyas formulaciones se detallan en el apartado 3.9.2.

Tras la aplicación de los métodos sol-gel y spray drying para la inmovilización enzimática orientada a la recuperación de P, y con el objetivo de mejorar la eficiencia y estabilidad de las formulaciones, se exploró el uso del método de **polimerización en masa** para la fabricación de hidrogeles de PAAm. Este material se propuso como soporte alternativo a las matrices previas basadas en citosano, que mostraron limitaciones en cuanto a resistencia mecánica, reutilización y estabilidad en medios alcalinos. En esta nueva estrategia, se encapsuló la dosis R25 de enzima, seleccionada previamente por su adecuado equilibrio entre eficacia de liberación de P y coste del proceso. Los hidrogeles obtenidos fueron evaluados inicialmente en condiciones controladas, utilizando ácido fólico como sustrato modelo, y posteriormente aplicados a muestras reales de fango mezcla, con el fin de validar su funcionalidad en entornos operativos más complejos.

Por último, cabe resaltar que, a partir de los ensayos enzimáticos realizados con fango secundario (lote “S”) y fango mezcla (lote “M”), se observó que este último presentó liberaciones netas de $P-PO_4$ significativamente superiores, lo que lo convierte en una opción más adecuada para la posterior recuperación de P. Si bien el fango secundario mostró mayores porcentajes de eficacia, estos se explican por su bajo contenido en sólidos y una sobredosificación relativa de enzima. En contraste, el fango mezcla permite tratar una mayor carga de P con una menor cantidad de enzima, lo que supone una ventaja tanto técnica como económica. Por ello, se optó por utilizar este tipo de sustrato en el presente lote de ensayos con encapsulación enzimática (lote “I”).

4.1.9.1. MÉTODO SOL-GEL

En la Tabla 33 se presentan la nomenclatura y las características de los ensayos enzimáticos con enzimas encapsuladas mediante método sol-gel, incluyendo la relación Citosano (CS): Crosslinker (TEOS), el número de ciclos de ensayos enzimáticos realizados, así como la correspondencia con los ensayos del lote “M” realizados de forma simultánea a los ensayos con enzima encapsulada. Esta correspondencia indica que se utilizó el mismo fango mezcla, por lo que la caracterización físico-química de estos ensayos coincide con la del correspondiente ensayo del lote “M”. Por ejemplo, en el caso de los ensayos I-SG1, el primer ciclo se llevó a cabo de forma simultánea con el ensayo M10, por lo que comparten la misma caracterización del fango mezcla. De este modo, fue posible obtener resultados comparables entre distintos reactores: R0 (control sin adición de enzima), R25 (con enzima libre a la misma concentración que la encapsulada) y los reactores con la adición individual de cada uno de los productos enzimáticos encapsulados. Esta disposición experimental permitió comparar de forma directa la eficacia de los distintos formatos de encapsulación frente al control y frente a la enzima en su forma libre.

En los **ensayos I-SG1** (ver Tabla 33) se evaluaron los productos R25-PASTILLAS #1 y #2, encapsulados con relaciones CS:TEOS de 3:1 y 1:1, respectivamente. El objetivo era analizar el efecto de esta proporción sobre la consistencia del producto encapsulado, así como su durabilidad a lo largo de varios ciclos. El secado de estos productos se realizó de forma natural, siguiéndose el procedimiento descrito en el apartado 3.9.1. Los productos finales obtenidos se presentan en la Figura 59, observándose una consistencia grumosa, de aspecto seco y ligeramente pulverulento, con aglomerados de morfología irregular. Ambos productos permitieron evaluar el comportamiento de la enzima encapsulada a lo largo de tres ciclos de ensayos enzimáticos.

Tabla 33. Nomenclatura y características de los ensayos correspondientes al lote “I”-método sol-GEL.

Ensayos	Nomenclatura Producto enzimático encapsulado	Relación Citosano (CS)/ Crosslinker (TEOS)	Nº Ciclos	Correspondencia con ensayos lote “M”
I-SG1	R25-PASTILLAS #1	3:1	3	1 ^{er} ciclo – M10
	R25-PASTILLAS #2	1:1		2 ^o ciclo – M12 3 ^{er} ciclo – M13
I-SG2	R25-GEL #1	1:1	2	1 ^{er} ciclo – M12
	R25-GEL #2	3:1	1	2 ^o ciclo – M13

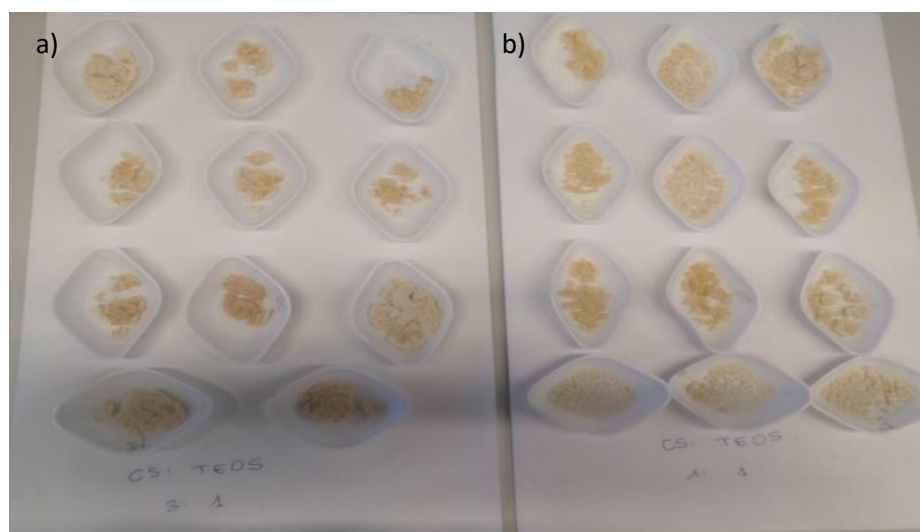


Figura 59. Productos obtenidos: PASTILLAS R25#1 (a) y PASTILLAS R25#2 (b).

En el **primer ciclo** de estos ensayos (ver Figura 60), se registraron liberaciones acumuladas a las 22 horas en torno a los 110 mg P·L⁻¹ en ambos reactores enzimáticos. La enzima libre (R25), del ensayo M10-lote “M”) alcanzó los 104,9 mg P·L⁻¹, mientras que el control sin enzima (R0) mostró una liberación mucho menor, de 42,7 mg P·L⁻¹.

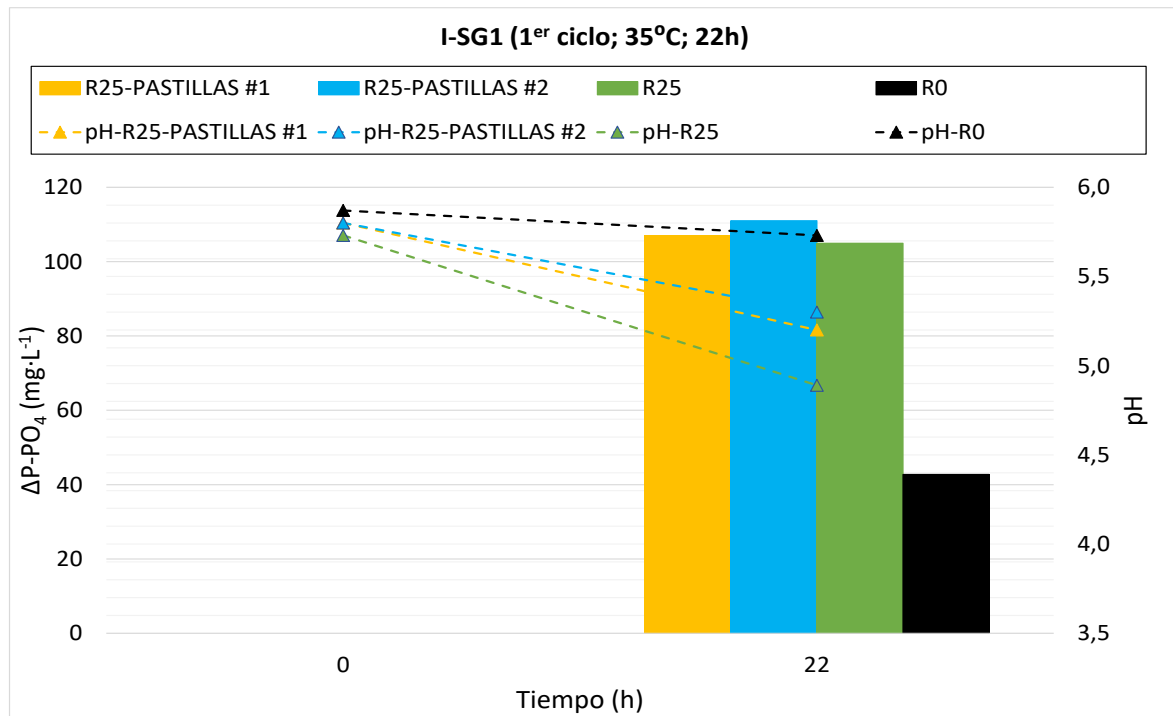


Figura 60. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en el primer ciclo de los ensayos I-SG1.

Trascurridas las 22 horas, es decir, el primer ciclo de ensayo, el contenido de los reactores con enzima encapsulada (R25-PASTILLAS #1 y R25-PASTILLAS #2) se hizo pasar por un tamiz de 2 mm de apertura de malla. De esta forma, se recuperó el producto encapsulado de ambos reactores (ver Figura 61). La textura del material recuperado se describe como grumosa y húmeda, con una apariencia granulada y pegajosa.

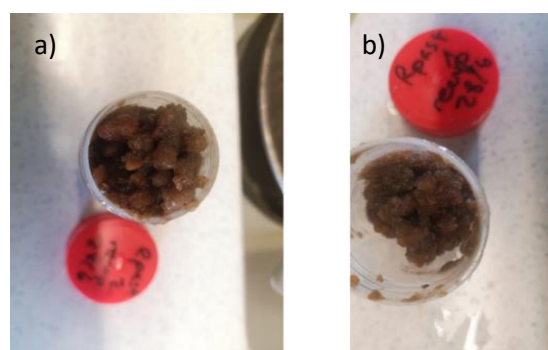


Figura 61. R25-PASTILLAS #1 (a) y R25-PASTILLAS #2 (b) recuperadas en el primer ciclo.

Cada producto recuperado se reintrodujo posteriormente en un **segundo ciclo** de ensayos, desarrollados en paralelo al ensayo M12-lote "M". Durante este ciclo (ver Figura 62), se observó una

disminución general de la liberación acumulada de $P-PO_4$: 77,0 $mg\ P\cdot L^{-1}$ (PASTILLAS #1), 67,0 $mg\ P\cdot L^{-1}$ (PASTILLAS #2), 44,3 $mg\ P\cdot L^{-1}$ (enzima libre) y 13,8 $mg\ P\cdot L^{-1}$ (R0).

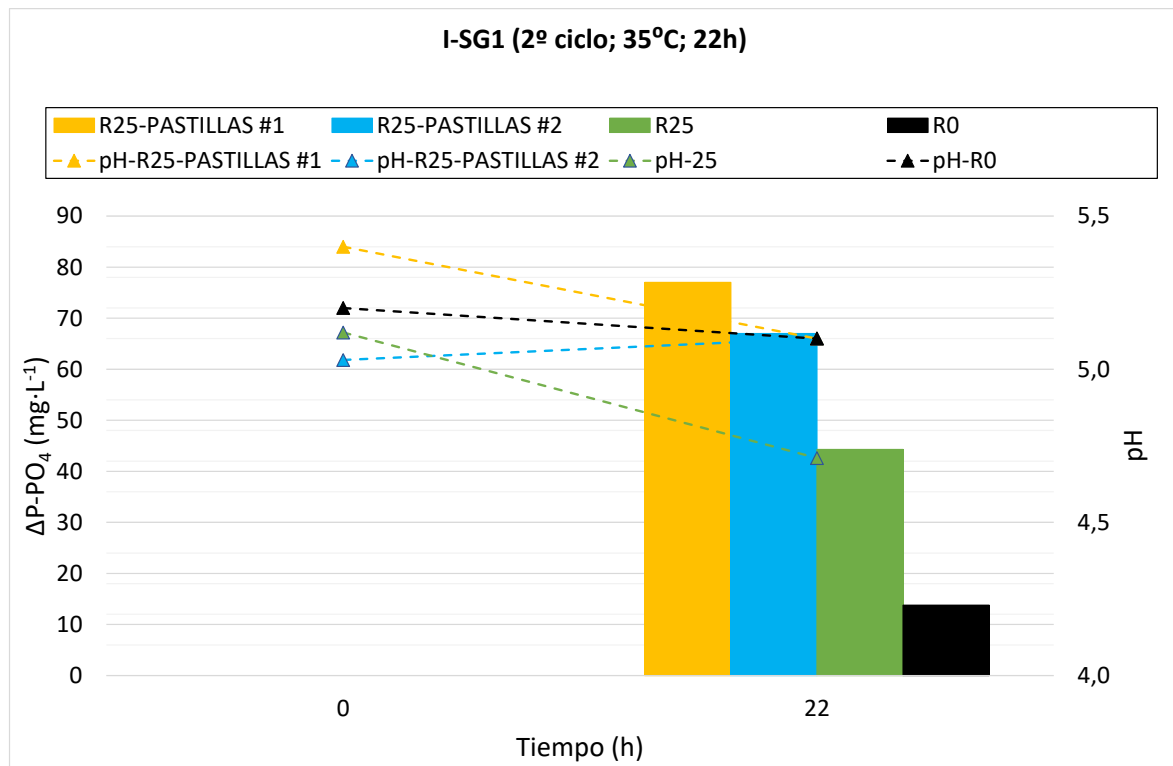


Figura 62. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en el segundo ciclo de los ensayos I-SG1.

Tras este segundo ciclo, la consistencia del producto encapsulado recuperado (ver Figura 63) fue bastante menos granulada, más homogénea y húmeda. Este producto recuperado se introdujo en un tercer ciclo de ensayos.

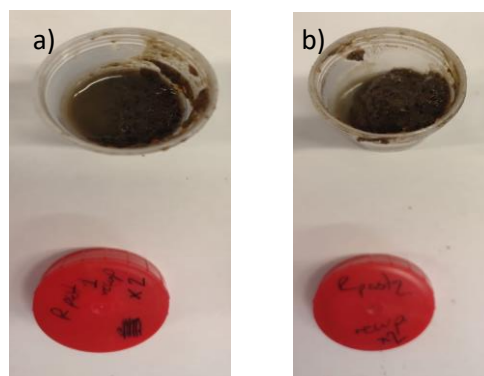


Figura 63. R25-PASTILLAS #1 (a) y R25-PASTILLAS #2 (b) recuperadas en el segundo ciclo.

Por último, en el **tercer ciclo** (llevado en paralelo con el ensayo M13-lote “M”) (ver Figura 64), la actividad se recuperó parcialmente, con liberaciones de 97,0 mg P·L⁻¹ (PASTILLAS #1), 113,0 mg P·L⁻¹ (PASTILLAS #2), 80,2 mg P·L⁻¹ (enzima libre) y 33,4 mg P·L⁻¹ en el control. Tras este último ciclo, no fue posible recuperar producto encapsulado de los reactores R25- PASTILLAS #1 y #2.

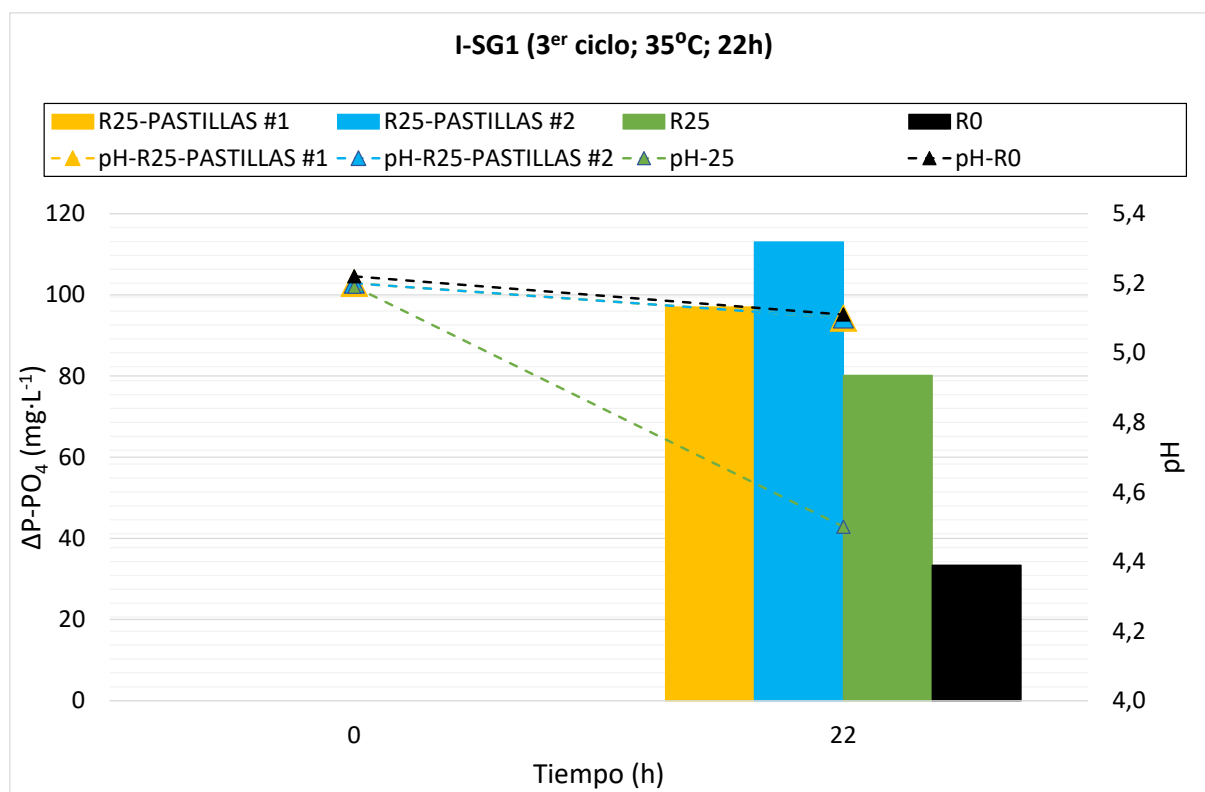


Figura 64. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en el tercer ciclo de los ensayos I-SG1.

En términos comparativos, los resultados obtenidos a lo largo de los tres ciclos del ensayo I-SG1 evidencian que la enzima encapsulada mediante el método sol-gel mantiene una capacidad de liberación de P-PO₄ similar, e incluso superior en algunos casos, a la de la enzima libre. En los ciclos 1 y 3, las PASTILLAS encapsuladas lograron liberar cantidades de P-PO₄ equiparables (e incluso mayores) que las alcanzadas por la fitasa en su forma libre, con diferencias especialmente notables en el tercer ciclo, donde R25–Pastilla #2 alcanzó los 113,0 mg P·L⁻¹ frente a los 80,2 mg P·L⁻¹ obtenidos con la enzima libre. Aunque en el segundo ciclo la actividad general disminuyó, las PASTILLAS siguieron mostrando un rendimiento superior al control y a la fitasa libre en ciertos casos, lo que sugiere una mayor estabilidad operativa del formato encapsulado.

En cuanto al comportamiento del pH, se observó una tendencia consistente en los tres ciclos: en los reactores con adición de enzima, ya sea libre o encapsulada, el pH disminuyó de forma moderada o pronunciada a lo largo de las 22 horas de operación. En el primer ciclo, el pH descendió desde valores iniciales cercanos a 5,8 hasta alrededor de 5,2 en los sistemas con PASTILLAS, y hasta 4,9 en el reactor con enzima libre. En contraste, el pH en el control (R0) apenas varió, manteniéndose entre 5,7 y 5,9. Este patrón se repitió en los ciclos 2 y 3, indicando que la acidificación del medio es coherente con la actividad de las enzimas fitasas y las bacterias acidogénicas presentes en el sistema. Cabe destacar que la disminución del pH en los sistemas con enzima encapsulada fue más atenuada en comparación con la observada en el sistema con enzima libre, lo que sugiere un efecto de liberación controlada asociado a la encapsulación.

En la Tabla 34 se recogen los principales parámetros utilizados para evaluar la eficacia de la liberación de P inducida por la acción de las enzimas encapsuladas en los ensayos I-SG1, durante los tres ciclos realizados. Se presentan los valores iniciales de P_T y $P-PO_4$ del fango mezcla empleado, a partir de los cuales se calcularon los parámetros P_{org} disponible y P_{org} hidrolizado. Asimismo, se incluyen los resultados obtenidos de los ensayos enzimáticos, como la liberación neta de $P-PO_4$ atribuible a la acción de las fitasas ($\Delta P-PO_4$ ENZIMA) y el porcentaje de eficacia del proceso, definidos previamente en el apartado 3.7.2 de la METODOLOGÍA.

En el primer ciclo del ensayo I-SG1, la liberación neta de $P-PO_4$ en el reactor con enzima libre (R25) fue de $62 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que en los reactores con enzima encapsulada (R25-PASTILLAS #1 y #2) se obtuvieron valores ligeramente superiores: $64 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $68 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. Estos resultados sugieren que la formulación encapsulada mediante el método sol-gel mantuvo la capacidad de liberación de $P-PO_4$ al mismo nivel que la forma libre. En términos de porcentajes de eficacia en este ciclo la enzima libre (R25) presentó una eficacia del 17,8%, mientras que R25-PASTILLAS #1 y #2 alcanzaron valores de 18,4% y 19,6%, respectivamente. Estos resultados respaldan que la encapsulación no solo conservó la actividad enzimática, sino que permitió un rendimiento igual o ligeramente superior, posiblemente por una liberación más sostenida de la enzima activa en el medio.

Tabla 34. Descripción de los ensayos I-SG1: ciclos, características del fango y resultados experimentales.

Ensayos	Nº ciclo	Reactor	P _T	P-PO ₄	P _{org} disponible	P _{org} hidrolizado	ΔP-PO ₄ ENZIMA	Eficacia
			mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
I-SG1	1	R25	592	242,5	349	41	62	17,8
		R25-PASTILLAS #1					64	18,4
		R25-PASTILLAS #2					68	19,6
	2	R25	790	352,4	438	45	31	7,0
		R25-PASTILLAS #1					63	14,4
		R25-PASTILLAS #2					53	12,2
	3	R25	827	391,1	436	47	47	10,7
		R25-PASTILLAS #1					64	14,6
		R25-PASTILLAS #2					80	18,3

Durante el segundo ciclo, la liberación neta de P-PO₄ disminuyó notablemente para R25, siendo solo de 31 mg P·L⁻¹. En contraste, las PASTILLAS mantuvieron niveles de liberación significativamente superiores (63 mg P·L⁻¹ y 53 mg P·L⁻¹, respectivamente). Este comportamiento indica una mayor estabilidad o resistencia de la enzima encapsulada frente a posibles condiciones desfavorables del medio, como cambios de pH o inhibición por exceso de sustrato. En términos de porcentaje de eficacia para este segundo ciclo, la enzima libre (R25) obtuvo un 7,0%, mientras que las formulaciones encapsuladas lograron 14,4% (PASTILLAS #1) y 12,2% (PASTILLAS #2). La diferencia entre la enzima libre y la encapsulada se acentuó en este ciclo, reflejando una mayor estabilidad o capacidad de acción prolongada de la enzima encapsulada frente a una posible pérdida de actividad de la forma libre.

En el tercer ciclo se obtuvieron de nuevo niveles de liberación más altos. El reactor con enzima libre (R25) registró 47 mg $P \cdot L^{-1}$, mientras que los reactores con enzima encapsulada alcanzaron 64 mg $P \cdot L^{-1}$ (PASTILLAS #1) y 80 mg $P \cdot L^{-1}$ (PASTILLAS #2). Estos resultados no solo superan a la forma libre, sino que muestran una destacada eficacia de las PASTILLAS #2, que obtuvo la mayor liberación neta de todo el ciclo. En este caso, cabe destacar que se utilizó una formulación con una relación Citosano (CS): Crosslinker (TEOS) de 1:1, diferente a la empleada en las PASTILLAS #1. Este desempeño sugiere que una proporción proporcional entre CS y TEOS podría favorecer una matriz más adecuada para la protección y liberación controlada de la enzima. No obstante, dado que estas diferencias se observan con mayor claridad solo en el tercer ciclo, en los siguientes ensayos se siguieron probando relaciones CS:TEOS de 1:1 y 3:1. Los porcentajes de eficacia para este último ciclo fueron de 10,7% para R25, mientras que R25-PASTILLAS #1 y #2 obtuvieron 14,6% y 18,3%, respectivamente. Este ciclo refuerza la tendencia observada en los anteriores: la encapsulación no solo mantiene la actividad enzimática tras múltiples usos, sino que puede optimizar la liberación de $P-PO_4$ en condiciones de operación similares.

En conjunto, los resultados obtenidos en los ensayos I-SG1 evidencian que las formulaciones de enzima encapsulada mediante sol-gel presentan un comportamiento estable y eficiente a lo largo de los tres ciclos experimentales. Frente a la enzima libre, las PASTILLAS encapsuladas mostraron una mayor capacidad de liberación de $P-PO_4$ y mejores porcentajes de eficacia, especialmente en condiciones repetidas de operación. Estos resultados ponen de manifiesto la viabilidad técnica del uso de fitasa encapsulada como alternativa eficaz a la adición convencional de enzima libre. Además de ofrecer una liberación sostenida de P, el producto encapsulado podría presentar ventajas en términos de reutilización, protección frente a condiciones adversas y posible reducción de costes en aplicaciones a escala real. Es importante subrayar que, al no requerir una nueva adición de enzima en cada ciclo, el uso de pastillas encapsuladas implica un ahorro significativo en la cantidad de enzima utilizada, ya que se mantienen niveles de liberación iguales o superiores durante tres ciclos consecutivos. No obstante, este ahorro debe evaluarse en conjunto con los costes asociados al proceso de inmovilización para determinar su viabilidad económica en aplicaciones a escala real.

En los **ensayos I-SG2** se evaluaron los productos encapsulados R25-GEL #1 y #2, con relaciones CS:TEOS de 1:1 y 3:1, respectivamente (ver Tabla 33). Estos materiales fueron preparados según el procedimiento descrito en el apartado 3.9.1, dando lugar a geles mediante el proceso sol-gel. La Figura 65 muestra la apariencia final de estos productos: (a) GEL R25#1 y (b) GEL R25#2. En ambos casos, los geles formados presentaron una consistencia vítrea y quebradiza, con un aspecto sólido, translúcido y ligeramente amarillento.

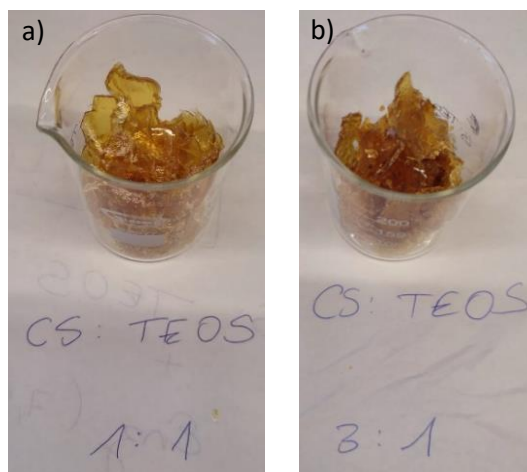


Figura 65. Productos obtenidos: GEL R25#1 (a) y GEL R25#2 (b).

Al igual que en I-SG1, se buscaba evaluar el impacto de la relación CS:TEOS sobre las características de los productos encapsulados. La principal diferencia con respecto a los ensayos I-SG1 fue, como se ha comentado anteriormente, el empleo de un secado forzado (a 120 °C durante 8 horas), lo que dio lugar a estructuras de tipo gel con propiedades fisicoquímicas diferentes permitiendo estudiar cómo influye el método de secado y la proporción de crosslinker en la estabilidad y eficacia del sistema encapsulado. Esta condición pareció afectar negativamente a la durabilidad de las encapsulaciones dado que sólo se pudieron realizar dos ciclos experimentales con R25-GEL #1 y un ciclo con R25-GEL #2, debido a la imposibilidad de recuperar producto suficiente para repetir el ensayo. Los ensayos se desarrollaron de forma paralela a determinados ensayos del lote “M”: el primer ciclo de I-SG2 coincidió con M12 y el segundo ciclo con M13.

En el **primer ciclo** de ensayos I-SG2 (ver Figura 66), se observó un marcado aumento del pH al inicio del experimento en los reactores con enzima encapsulada, alcanzando valores de hasta 9,2 en R25-GEL #1 y 8,6 en R25-GEL #2.

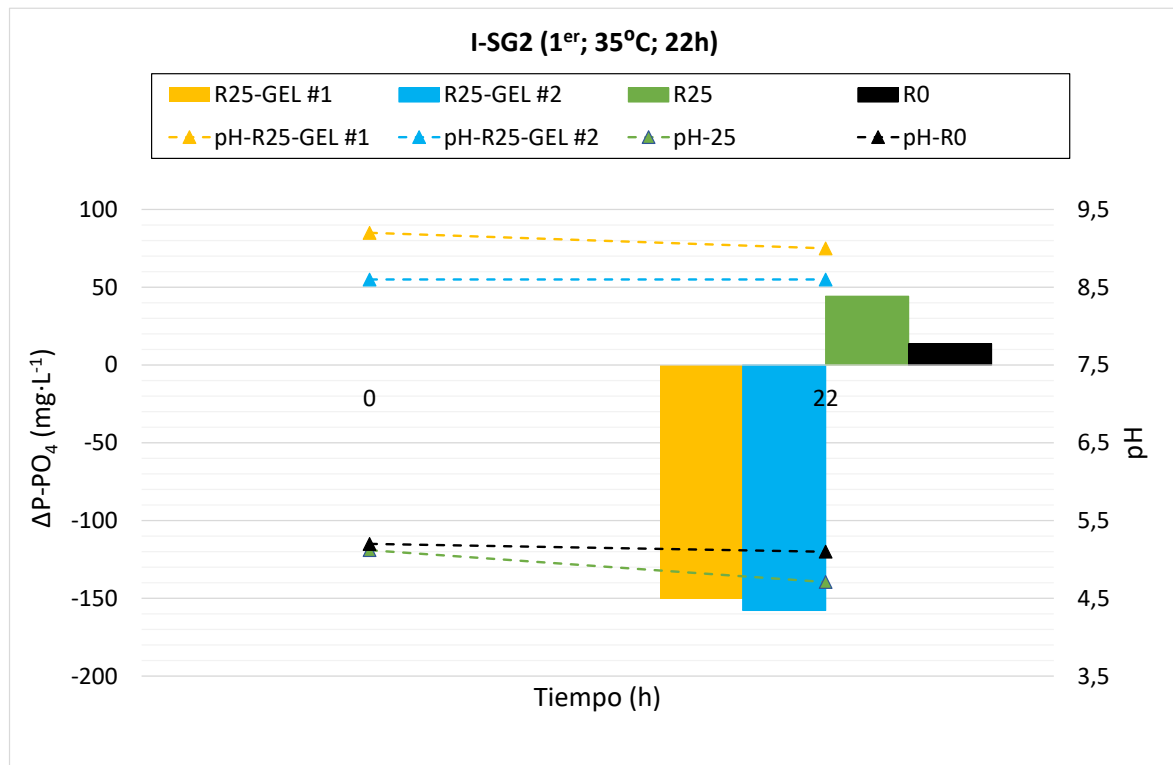


Figura 66. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en el primer ciclo de los ensayos I-SG2.

Este incremento se atribuye a la degradación del citosano (CS), que libera aminas al medio, presentes en la estructura química (ver Figura 15), lo que provocó una alcalinización del medio. Dicha degradación se asocia al estrés térmico del secado, lo que habría acelerado la hidrólisis del TEOS durante la formación del gel, generando especies ácidas que se liberaron al medio una vez se puso en contacto el gel con el fango. Este hecho pudo afectar al CS, ya que es sensible al pH ácido y puede haberse degradado (Ahmad et al., 2023; Krajewska, 2004). Esta alteración del pH pudo provocar precipitaciones de $P-PO_4$ al inicio del ensayo, lo cual explicaría los bajos valores de concentración de $P-PO_4$ registrados a tiempo (0h) para ambos geles en comparación con la enzima libre (R25) o el reactor de referencia (R0).

Transcurridas 22 horas de este primer ciclo de ensayos I-SG2 (ver Figura 66), se observaron decrementos acumulados en la concentración de $P-PO_4$ en los reactores que contenían el producto enzimático encapsulado: específicamente, una reducción de $-149,8 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en el reactor R25-GEL #1 y de $-157,8 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R25-GEL #2. En contraste, los sistemas con enzima libre (R25) y el control sin enzima (R0) mostraron incrementos en la concentración de $P-PO_4$, con liberaciones acumuladas de $44,3 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $13,8 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Estos resultados se interpretan atendiendo a las concentraciones de $P-PO_4$ iniciales y finales en cada uno de los reactores puestos en marcha, representadas en la Figura 67. A tiempo 0 h, las concentraciones de $P-PO_4$ en los reactores con geles (R25-GEL #1 y R25-GEL #2) son significativamente menores ($101 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $124 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) en comparación con el control R0 ($352 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$). Esta diferencia se explica por un fenómeno de precipitación de $P-PO_4$, inducido por los elevados valores de pH inicial en los sistemas con geles (entre 8,6 y 9,2, como se observa en la Figura 66). Bajo estas condiciones alcalinas, es probable que una fracción importante del P soluble haya precipitado, haciendo que las mediciones iniciales subestimen el $P-PO_4$ realmente presente en el sistema.

Cabe destacar que, al finalizar el ensayo (22 h), el pH en los reactores con geles se mantuvo dentro del mismo rango alcalino (8,6–9, ver Figura 66). Esto es relevante porque descarta la posibilidad de que los aumentos finales en las concentraciones de $P-PO_4$ se deban a una redisolución de los precipitados formados inicialmente (concentraciones finales de $P-PO_4$ de $216 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R25-GEL #1 y de $208 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R25-GEL #2). Por tanto, estos pueden atribuirse a la acción hidrolítica por parte de las enzimas encapsuladas, que queda enmascarada por procesos de precipitación asociados al pH alcalino que se alcanza en estos reactores.

Al final del primer ciclo, se procedió a la recuperación del producto encapsulado de los reactores R25 GEL #1 y #2. Para ello, se filtró el contenido de estos reactores a través de un tamiz, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en los ensayos I-SG1. En este caso, sólo fue posible recuperar el contenido del producto encapsulado en el reactor R25- GEL #1 (ver Figura 68).

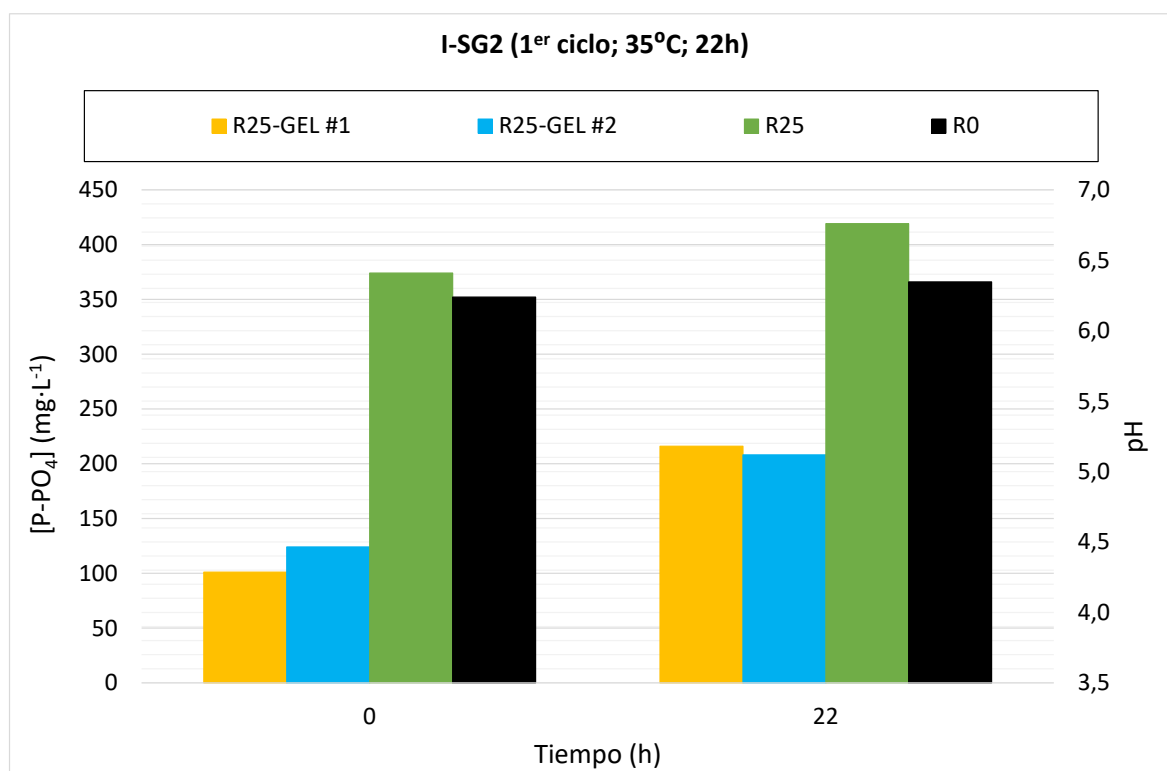


Figura 67. Evolución de la concentración de P-PO₄ en el primer ciclo de los ensayos I-SG2.



Figura 68. Productos recuperados: R25- GEL #1 recuperado tras el primer ciclo.

Como puede observarse en la Figura 68, con respecto a la cantidad de producto añadida al inicio del ensayo (ver Figura 65 a), se observó que había una disminución considerable del producto, hasta casi desaparecer por completo. El escaso material recuperado se reintrodujo posteriormente en un segundo ciclo de ensayos.

En el **segundo ciclo** de ensayos I-SG2 (ver Figura 69), no se registraron alteraciones significativas del pH inicial, lo que podría atribuirse a la mínima cantidad de producto que se reintrodujo en este segundo ciclo de ensayos y a que, probablemente, los grupos amina de la degradación del CS que contribuyeron a la subida de pH en el primer ciclo, ya habrían reaccionado casi por completo en dicho ciclo. Así, a diferencia del primer ciclo de ensayos, no se observó precipitación de $P-PO_4$ al inicio del ensayo.

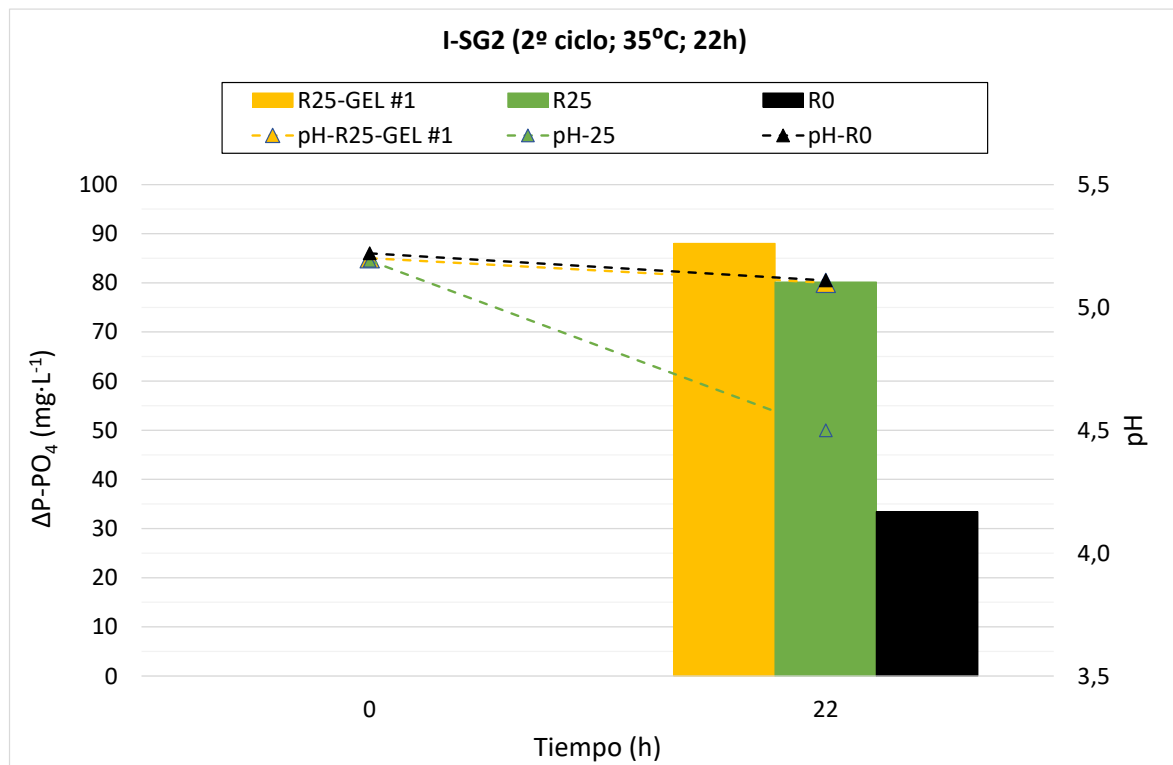


Figura 69. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en el segundo ciclo de los ensayos I-SG2.

Transcurridas las 22 horas, se observó una liberación acumulada de $88,0 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ en el reactor con el producto encapsulado R25-GEL #1, de $80,2 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ en el sistema con enzima libre (R25) y de $33,4 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ en el control sin enzima (R0). Estos resultados confirman que, a pesar de haber sido reutilizado, el producto encapsulado en formato gel mantuvo un rendimiento superior al del control y ligeramente superior al de la enzima libre.

En cuanto a la evolución del pH, se observaron diferencias relevantes con respecto al primer ciclo: en esta segunda fase, la variación de pH fue mínima en los sistemas R25-GEL #1 y R0, pasando ambos

de 5,2 a 5,1. Por su parte, en el reactor con enzima libre (R25), el pH descendió de forma más marcada, de 5,2 a 4,5. Esto indica claramente que la enzima encapsulada mantuvo una actividad efectiva, sin generar una acidificación apreciable del medio, como sí ocurrió con la enzima libre (R25).

En la Tabla 35 se resumen los parámetros clave para evaluar la eficacia de la liberación de $P\text{-PO}_4$ en los ensayos I-SG2 en cada ciclo definidos en el apartado 3.7.2 de la METODOLOGÍA. Cabe destacar que en esta tabla solo se presentan las características y resultados correspondientes al segundo ciclo de los ensayos I-SG2. Esta decisión se debe a que, en el primer ciclo, aunque las enzimas encapsuladas en los reactores R25-GEL #1 y #2 promovieron la liberación de $P\text{-PO}_4$ mediante su acción hidrolítica, dicho efecto quedó enmascarado por la precipitación de este bajo las condiciones de pH alcalino alcanzadas. Como resultado, las concentraciones de $P\text{-PO}_4$ medidas no reflejan fielmente la actividad enzimática real. Debido a esta limitación analítica, los resultados del primer ciclo han sido excluidos del análisis.

Tabla 35. Descripción de los ensayos I-SG2: ciclos, características del fango y resultados experimentales.

Ensayos	Nº ciclo	Reactor	P_T	$P\text{-PO}_4$	$P_{\text{org disponible}}$	$P_{\text{org hidrolizado}}$	$\Delta P\text{-PO}_4 \text{ ENZIMA}$	Eficacia
			mg $P\cdot L^{-1}$	mg $P\cdot L^{-1}$	mg $P\cdot L^{-1}$	%	mg $P\cdot L^{-1}$	%
I-SG2	2	R25	827	391,1	436	47	47	10,7
		R25-GEL #1					55	12,5

Como se observa en la Tabla 35, los valores de P_T (827 mg $P\cdot L^{-1}$) y $P_{\text{org disponible}}$ (438 mg $P\cdot L^{-1}$) indican que el sustrato (fango mezcla) utilizado en el segundo ciclo de ensayos I-SG2, presentaba una proporción significativa de P potencialmente hidrolizable, similar a la observada en los ensayos del grupo I-SG1, con un valor de $P_{\text{org hidrolizado}}$ de 47 % del P_T .

Así mismo, en este segundo ciclo, la enzima libre (R25) presentó una liberación neta de 47 mg $P\cdot L^{-1}$ y una eficacia del 10,7 %, mientras que R25-GEL #1 alcanzó una liberación neta de 55 mg $P\cdot L^{-1}$ y una

eficacia del 12,5 %, mostrando valores ligeramente superiores con respecto a los de la enzima libre. Este comportamiento está en consonancia con lo observado en los ensayos I-SG1, donde las formulaciones encapsuladas (PASTILLAS) también igualaron o superaron a la enzima libre en términos de liberación de P-PO₄ y eficacia (hasta 19,4 % en PASTILLAS vs. 17,8 % en libre).

En conjunto, los resultados del ensayo I-SG2 indican que el formato gel, tras las alteraciones iniciales asociadas a su inestabilidad química (evidenciada por una drástica elevación del pH en el primer ciclo), experimentó una desintegración progresiva. No obstante, los restos del gel mantuvieron cierta actividad enzimática, como se refleja en la liberación neta de P-PO₄ observada durante el segundo ciclo. Esto sugiere que, aunque el soporte de gel pierde integridad estructural, el producto encapsulado conserva parcialmente su funcionalidad. No obstante, en términos comparativos, el rendimiento observado en los ensayos previos con el formato en pastilla (I-SG1) fue superior tanto en liberación neta de P-PO₄ como en eficacia, lo que refuerza la idea de que la formulación en pastilla presenta un comportamiento más robusto y consistente bajo las condiciones ensayadas.

4.1.9.2. MÉTODO SPRAY-DRYING

En la Tabla 36 se presentan la nomenclatura y las principales características de los ensayos enzimáticos en los que se aplicaron enzimas encapsuladas mediante el método de spray-drying, incluyendo la relación Citosano (CS): Crosslinker (TEOS) y Citosano (CS): Crosslinker (APTES), el número de ciclos de ensayos enzimáticos realizados, así como la correspondencia con los ensayos del lote “M” realizados de forma simultánea a los ensayos con enzima encapsulada. Se realizaron un conjunto de 3 ensayos: I-SD1, I-SD2 e I-SD3, desarrollados con productos encapsulados mediante el método de spray-drying. A diferencia del enfoque seguido con el método sol-gel, y como se ha comentado anteriormente, en estos ensayos se optó, de forma general, por emplear una dosis enzimática de R50, como estrategia para compensar las posibles pérdidas de actividad derivadas de las condiciones térmicas agresivas propias del proceso de secado por atomización. Esta decisión buscaba asegurar un aporte suficiente de enzima activa, considerando que las altas temperaturas del procedimiento podrían haber afectado su funcionalidad. Por último, se incluyó una prueba con dosis R25 en el ensayo I-SD3, que tuvo como objetivo establecer un punto de comparación relevante, ya que esta dosis había mostrado buen rendimiento en ensayos previos, tanto con enzima libre como

con productos obtenidos por sol-gel. De este modo, se buscó evaluar si el encapsulado por spray-drying podía mantener niveles aceptables de eficacia incluso con una menor carga enzimática.

Tabla 36. Nomenclatura y características de los ensayos correspondientes al lote "I"-método spray drying.

Ensayos	Nomenclatura Producto enzimático encapsulado	Relación CS: TEOS	Relación CS:APTES	Nº Ciclos	Correspondencia con ensayos lote "M"
I-SD1	R50-SD #1	1:1	-	2	1er ciclo – M9 2do ciclo – M10
I-SD2	R50-SD #2	-	1:1	1	1er ciclo – M10
	R50-SD #3	-	3:1		
I-SD3	R25-SD#4	-	-	2	1er ciclo – M12
	R50-SD#5	-	-		2do ciclo – M13

El primer conjunto de **ensayos I-SD1** se desarrolló empleando una relación CS:TEOS 1:1, replicando la formulación que mejores resultados había proporcionado en los ensayos sol-gel. Así, el producto encapsulado R50-SD #1 se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.9.2. Durante su preparación se detectaron dificultades significativas para recuperar el producto encapsulado tras su procesamiento mediante spray drying, ya que gran parte del material quedó adherido o disperso en el interior del equipo, dificultando su recolección para el inicio del primer ciclo experimental. Como consecuencia, los rendimientos obtenidos en cuanto a cantidad de polvo efectivamente colectado fueron muy bajos. Así, su consistencia final fue considerablemente pegajosa y la cantidad de producto final obtenida fue bastante reducida (ver Figura 70). Este producto permitió llevar a cabo un total de dos ciclos consecutivos de ensayos enzimáticos.



Figura 70. Producto obtenido: R50 SD #1.

En el **primer ciclo** del ensayo I-SD1 (ver Figura 71), tras 22 horas de operación, se registraron liberaciones acumuladas de $72 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ para R50-SD#1, $74,5 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ para R50, y $40,0 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ para el control (R0). Estos resultados indican que la formulación encapsulada logró liberar una cantidad de P-PO_4 comparable a la de la enzima libre, y sustancialmente superior a la del sistema sin enzima. Una vez completado este ciclo, el contenido del reactor con producto encapsulado se tamizó para recuperar los restos del mismo, los cuales se reutilizaron en un segundo ciclo experimental. El material recuperado presentaba una consistencia blanda y fragmentada, evidenciando una degradación estructural considerable respecto al estado original del producto. Esta descomposición visible de la matriz del producto sugiere que el soporte sufrió una descomposición progresiva durante el ensayo.

En el segundo ciclo (ver Figura 72), se observó una liberación acumulada de P-PO_4 de $76 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ en el reactor con producto encapsulado, inferior a los $98,8 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ obtenidos con la enzima libre. En el control (R0) se obtuvo un valor similar al observado en el primer ciclo para este reactor ($42,7 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$). Tras este segundo ciclo, no fue posible recuperar producto encapsulado de los reactores.

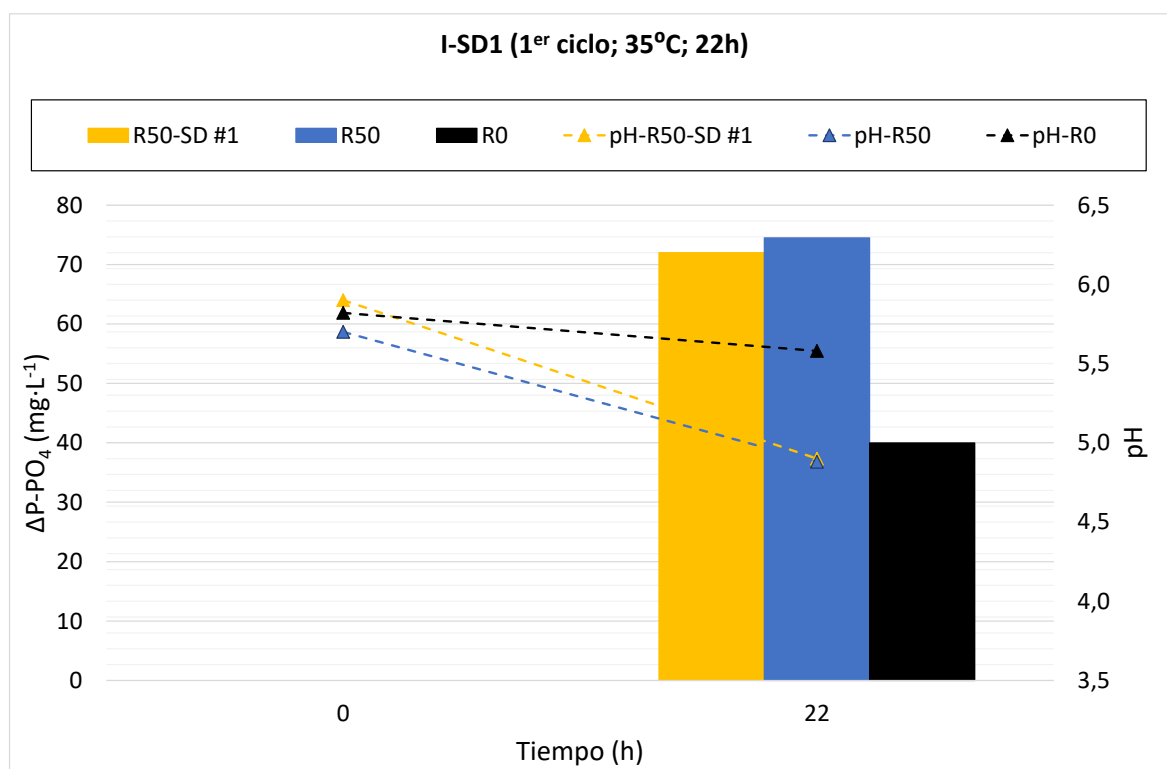


Figura 71. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en el primer ciclo de los ensayos I-SD1.

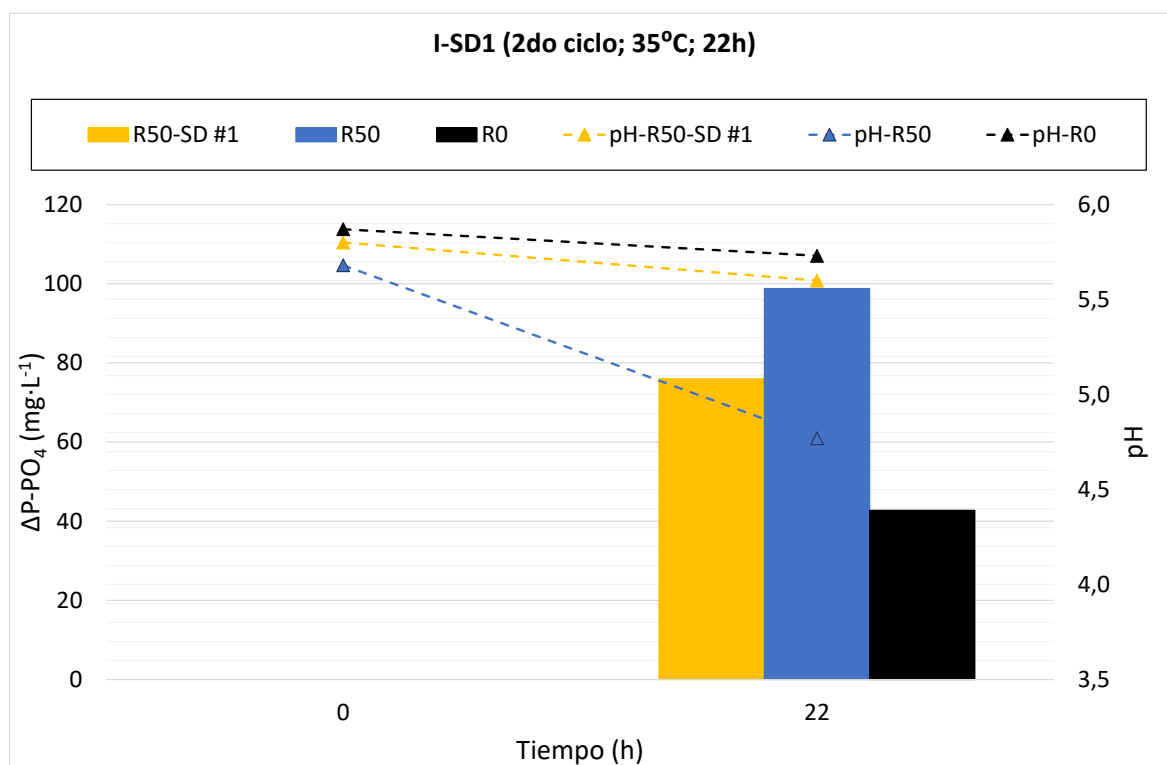


Figura 72. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en el segundo ciclo de los ensayos I-SD1.

En cuanto a la evolución del pH, los tres reactores mostraron una tendencia coherente con lo observado en los ensayos I-SG1: en el primer ciclo, el pH descendió hasta 4,9 en los reactores con enzima (tanto libre como encapsulada), mientras que en el control apenas varió (de 5,8 a 5,6). En el segundo ciclo, el pH en el reactor con enzima libre cayó nuevamente a 4,8, mientras que en el reactor con producto encapsulado descendió solo ligeramente (de 5,8 a 5,6), al igual que el control (de 5,9 a 5,7). La menor acidificación observada en el reactor con producto SD sugiere una liberación más progresiva de la enzima o una posible reducción parcial de su actividad, atribuible al proceso de encapsulación, aunque esta sigue siendo funcional.

En la Tabla 37 se presentan las características del fango mezcla utilizado en cada ensayo, así como los resultados en cuenta a liberación neta y porcentaje de eficacia del proceso para evaluar la acción de las enzimas encapsuladas en los ensayos I-SD1.

Tabla 37. Descripción de los ensayos I-SD1: ciclos, características del fango y resultados experimentales.

Ensayos	Nº ciclo	Reactor	P _T	P-PO ₄	P _{org} disponible	P _{org} hidrolizado	ΔP-PO ₄ ENZIMA	Eficacia
			mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
I-SD1	1	R50	701	230,2	471	33	35	7,3
		R50-SD #1					32	6,8
	2	R50	592	242,5	349	41	56	16,0
		R50-SD #1					33	9,5

Como se observa en la Tabla 37, durante el primer ciclo del ensayo I-SD1, los resultados de liberación neta de $P-PO_4$ fueron similares en el reactor con enzima libre (R50) y en el que contenía producto encapsulado por spray drying (R50-SD #1), con valores de $35 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $32 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Las eficacias obtenidas fueron del 7,3% en R50 y del 6,8% en R50-SD #1, lo que indica que la actividad enzimática del producto encapsulado se mantiene funcional.

En el segundo ciclo del ensayo, con un fango mezcla algo diferente (P_T : $592 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$; $P_{\text{org disponible}}$: $349 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $P_{\text{org hidrolizado}}$: 41%), se observó un aumento generalizado en la liberación neta de $P-PO_4$ y en la eficacia. El reactor con enzima libre (R50) alcanzó una liberación neta de $56 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y una eficacia del 16,0%, mientras que el reactor con producto encapsulado (R50-SD #1) liberó $33 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ con una eficacia del 9,5%. Aunque los valores fueron inferiores a los del formato libre, se confirma que la formulación en polvo sigue siendo operativa tras dos ciclos de ensayos.

En conjunto, los resultados de I-SD1 muestran que el producto encapsulado mediante spray-drying conserva parte de su eficacia y puede ser reutilizado al menos una vez. No obstante, su uso se limita a dos ciclos de ensayos, mientras que con los productos PASTILLAS #1 y #2 (ensayos I-SG1) fue posible realizar tres ciclos. En cuanto a eficacias, frente a las PASTILLAS #1 y #2 (I-SG1), el comportamiento del producto SD #1 fue más modesto: las formulaciones en pastilla lograron mayores liberaciones de $P-PO_4$ y eficacias más elevadas (hasta 19,4%), además de mostrar mejor estabilidad en múltiples ciclos.

Por su parte, en comparación con los geles (ensayos I-SG2), el producto SD #1 mostró un comportamiento inicial apropiado, sin los efectos adversos de pH observados en el primer ciclo de los geles. No obstante, en el segundo ciclo de los ensayos I-SG2 (realizado únicamente con R25-GEL #1, ya que R25-GEL #2 se desintegró por completo), para el reactor con enzima encapsulada se alcanzó un valor eficacia algo superior (hasta 12,5%).

Los resultados obtenidos con la formulación empleada en los ensayos I-SD1 mostraron que aunque el encapsulado obtenido por spray-drying logró mantener cierta funcionalidad, su rendimiento fue inferior al de las PASTILLAS #1 y #2 y, en parte, al del gel R25-GEL #1 reutilizado en el segundo ciclo

de ensayos I-SG2, lo que sugiere que este método requiere ajustes adicionales para igualar la eficacia de otras formulaciones encapsuladas. Además, cabe recordar las dificultades mencionadas para la recuperación del producto SD#1, así como la poca cantidad de polvo que se logró recoger.

Debido a todo lo expuesto, en el **ensayo I-SD2** se decidió modificar el crosslinker, sustituyendo TEOS por APTES, con el objetivo de mejorar la recuperación de producto encapsulado tras el proceso de spray drying. Como resultado, la cantidad de producto conseguido tras dicho proceso (ver Figura 73) fue significativamente superior a la observada en la obtención del producto SD #1 (ver Figura 70).



Figura 73. Producto obtenido: SD R50#2 (a) y SD R50#3 (b).

Estos productos fueron sometidos a un **primer ciclo** de ensayos I-SD2. La evolución de la liberación acumulada de $P-PO_4$ durante este ciclo se muestra en la Figura 74, donde se evidencia un comportamiento muy diferente entre los reactores con enzimas encapsuladas y los de enzima libre y control: en los primeros (R50-SD#2 y R50-SD#3), se registraron decrementos acumulados de $P-PO_4$ de $-114 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $-126 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. En contraste, tanto el reactor con enzima libre (R50) como el control sin enzima (R0) mostraron las liberaciones acumuladas positivas ($99 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ y $43 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente).

La Figura 74 recoge también la evolución del pH a lo largo del ensayo, donde destaca que, desde el inicio, los reactores con productos encapsulados presentaron pH alcalinos (entre 10,2 y 10,8). Estos valores contrastan notablemente con los registrados en los reactores R50 (pH 4,8) y R0 (pH 5,7). Este marcado incremento del pH en los reactores con enzima encapsulada guarda estrecha relación con los decrementos acumulados de P-PO₄ observados, los cuales pueden explicarse considerando las concentraciones iniciales de P-PO₄ en cada reactor (ver Figura 75).

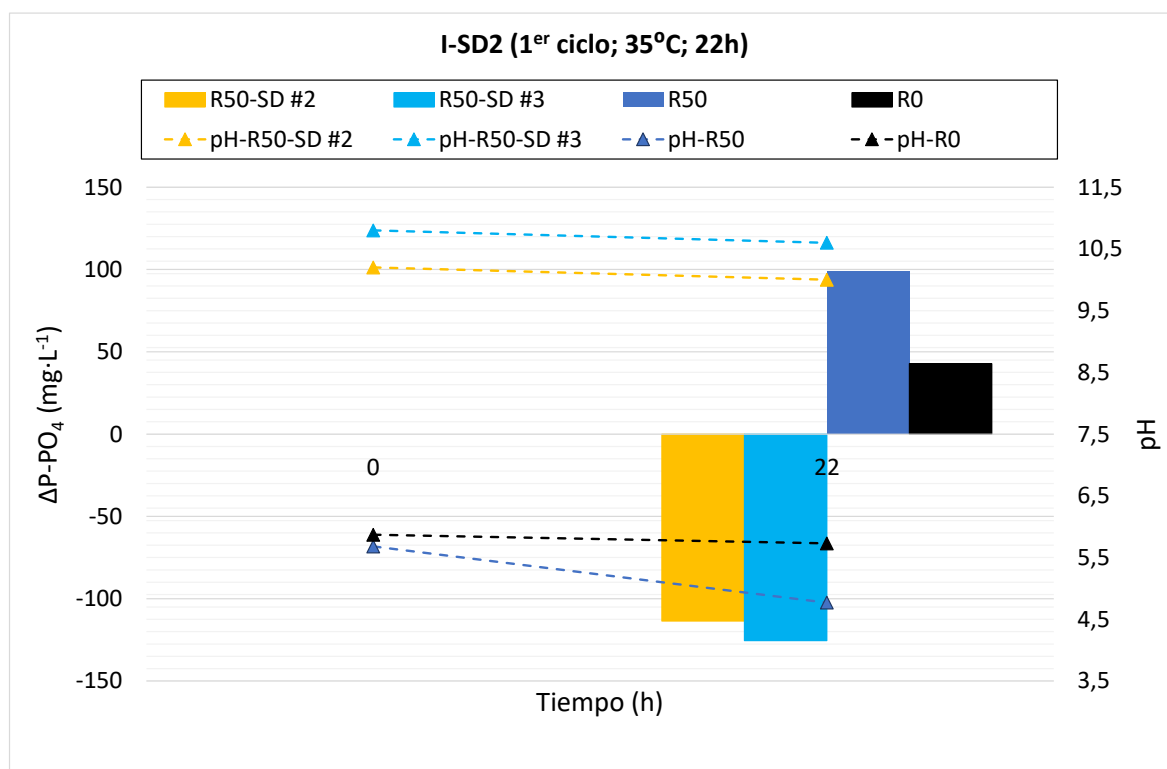


Figura 74. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en el primer ciclo de ensayos I-SD2.

En este sentido, mientras que el reactor con enzima libre (R50) presentó una concentración inicial de 293 mg P·L⁻¹ y el control (R0) de 242 mg P·L⁻¹, los reactores con productos encapsulados (R50-SD#2 y R50-SD#3) partieron de concentraciones mucho más bajas: 68 mg P·L⁻¹ y 65 mg P·L⁻¹, respectivamente. Esta notable diferencia se atribuye a una precipitación inicial significativa del P-PO₄, probablemente inducida por el fuerte incremento del pH tras la adición del producto encapsulado. Este fenómeno puede estar causado por la liberación de grupos aminos presentes en la estructura química del crossliker empleado (APTES) (ver Figura 17) (Krajewska, 2004; Vall et al., 2017).

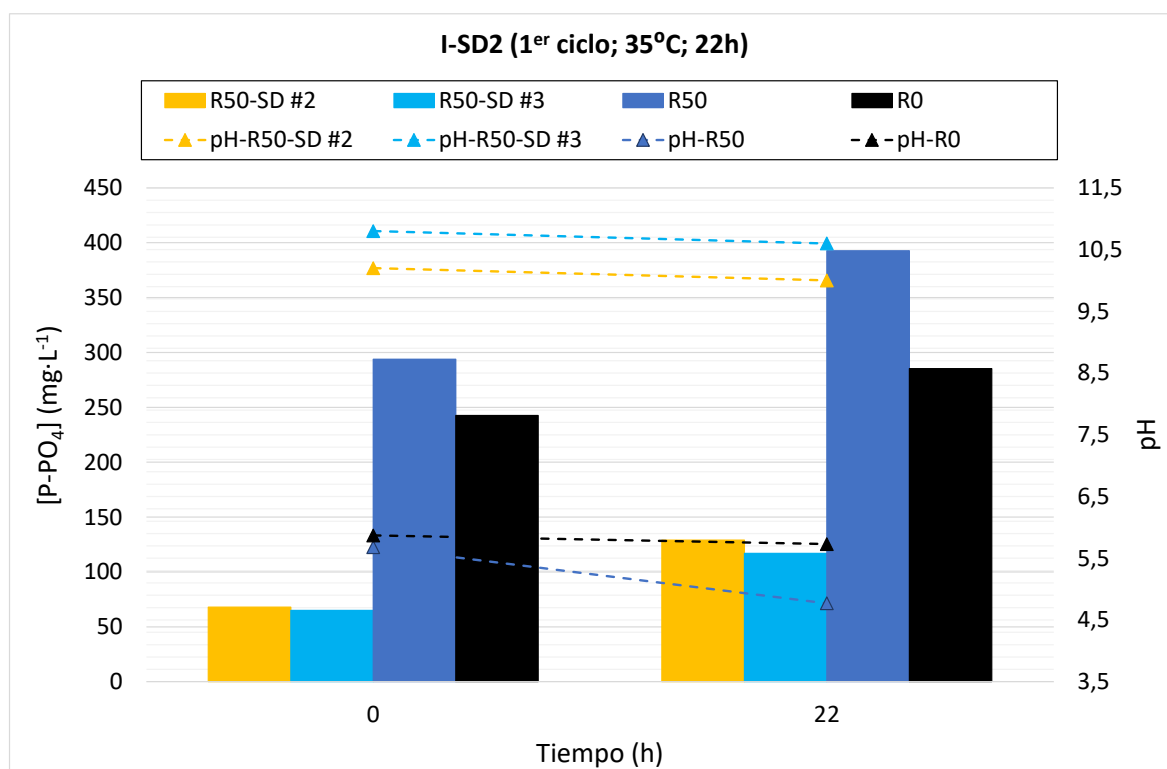


Figura 75. Evolución de la concentración de P-PO₄ en el primer ciclo de los ensayos I-SD2.

Esta alcalinización del medio se mantuvo prácticamente estable durante las 22 horas del ensayo, registrándose pH finales de 10 y 10,6 en los reactores con producto encapsulado (R50-SD #2 y R50-SD #3, respectivamente). Estos valores elevados de pH favorecieron la permanencia del P-PO₄ en forma precipitada, evitando su redisolución en el medio. No obstante, si se analizan las concentraciones finales de P-PO₄ en los reactores con producto encapsulado (129 mg P·L⁻¹ en R50-SD #2 y 117 mg P·L⁻¹ en R50-SD #3), se observa un incremento respecto a los valores iniciales, lo que sugiere cierta actividad hidrolítica por parte de la enzima encapsulada. Sin embargo, este efecto queda parcialmente enmascarado por los procesos de precipitación química derivados del pH alcalino sostenido, dificultando la interpretación directa de la acción enzimática.

En vista de los resultados de I-SD2, se concluye que el empleo de APTES como crosslinker en formulaciones, destinadas a encapsulación por spray drying, presenta limitaciones importantes. En particular, destaca su efecto que induce sobre el pH del medio, que afecta negativamente a la disponibilidad inicial de P-PO₄ en los reactores. Además, tras la aplicación de los productos R50-SD#2

y R50-SD#3 en un primer ciclo de ensayo, se observó una recuperación prácticamente nula del material encapsulado (ver Figura 76), lo que impidió la realización de un segundo ciclo de ensayos.



Figura 76. Productos recuperados: R50-SD#2 (a) y R50-SD#3 (b) recuperado tras el ensayo realizado.

Una vez evaluadas las formulaciones en las cuales se incluyó un crosslinker (TEOS o APTES), se identificaron desafíos significativos asociados a su uso. El uso de TEOS resultó en una baja recuperación del producto tras el spray drying, lo que compromete su aplicabilidad práctica al reducir la cantidad disponible para los ensayos. En cambio, aunque APTES mejoró la recuperación inicial, generó un medio fuertemente alcalino (pH 10–10,8) en los reactores, provocando la precipitación inmediata del $P-PO_4$ y dificultando la evaluación de la actividad enzimática. Además, el material encapsulado con APTES no pudo reutilizarse tras un primer ciclo, lo que limita su viabilidad para aplicaciones repetidas.

Ante estos desafíos técnicos (baja recuperación, pH desfavorable y escasa eficacia en la liberación de $P-PO_4$), en el **ensayo I-SD3** se prescindió del uso de crosslinkers y se elaboraron enzimas encapsuladas mediante spray-drying empleando únicamente una disolución de citosano (CS). Esta estrategia buscó no solo mejorar la recuperación y evitar interferencias en el pH del sistema, sino también simplificar el proceso de formulación. En este contexto, se generaron dos productos: R50-SD#4, manteniendo la dosis alta, y R25-SD#25, incorporando nuevamente la dosis R25 como referencia por su buen desempeño en ensayos previos. La consistencia final de cada producto puede observarse en la Figura 77. Cabe resaltar que las cantidades de producto obtenido, en ambos casos, es significativamente menor a la que se observó en el encapsulado correspondiente a los productos SD R50#2 y SD R50#3.

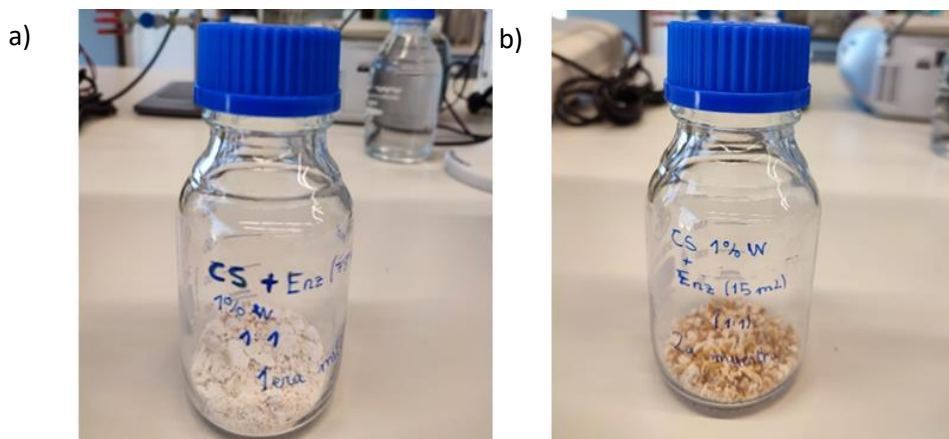


Figura 77. Producto obtenido: R25-SD #4 (a) y R50-SD #5 (b).

En el **primer ciclo** de ensayos I-SD3, se se observaron diferencias significativas en la liberación acumulada de $P-PO_4$ entre los reactores con enzimas encapsuladas (R25-SD#4 y R50-SD#5), los que contenían enzimas libres (R25 y R50) y el control sin enzima (R0) (ver Figura 78). En particular, el reactor R25-SD#4, que contenía una menor concentración de enzima encapsulada ($25 \text{ g enzima} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ fango}$), registró una liberación acumulada de $28 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$, superior a la del reactor R50-SD#5 ($7 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$) a pesar de que este último operaba con una mayor dosis de enzima ($25 \text{ g enzima} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ fango}$). Este resultado sugiere una posible saturación del sistema sustrato/enzima más acusada a mayor concentración enzimática. En contraste, los reactores con enzima libre (R25 y R50) mostraron valores de liberación significativamente más altos, de $44 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ en R25 y $46 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ en R50, con un comportamiento prácticamente indistinguible entre ambas concentraciones. Por último, el control sin enzima (R0), por su parte, presentó una liberación contenida de $13,8 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$.

Así mismo, en la Figura 78 se presenta la evolución del pH durante el primer ciclo de ensayos I-SD3. Si se analizan los valores iniciales de pH se observa que los reactores con productos encapsulados en citosano (CS), R25-SD #4 y R50-SD #5, presentaron valores de pH 5,7 y 5,9, respectivamente, valores ligeramente superiores al resto de reactores (5,-5,2). Una posible explicación a este comportamiento es la interacción superficial del citosano con el medio ácido. En este caso, a diferencia de otras formulaciones en las que el citosano se encontraba entrecruzado con agentes como TEOS o APTES, aquí se utilizó sin entrecruzamiento, lo que pudo favorecer su hinchamiento o disolución parcial al

inicio del ensayo. Este fenómeno podría haber liberado grupos amina al medio, capaces de captar protones, generando así una ligera alcalinización (Krajewska, 2004).

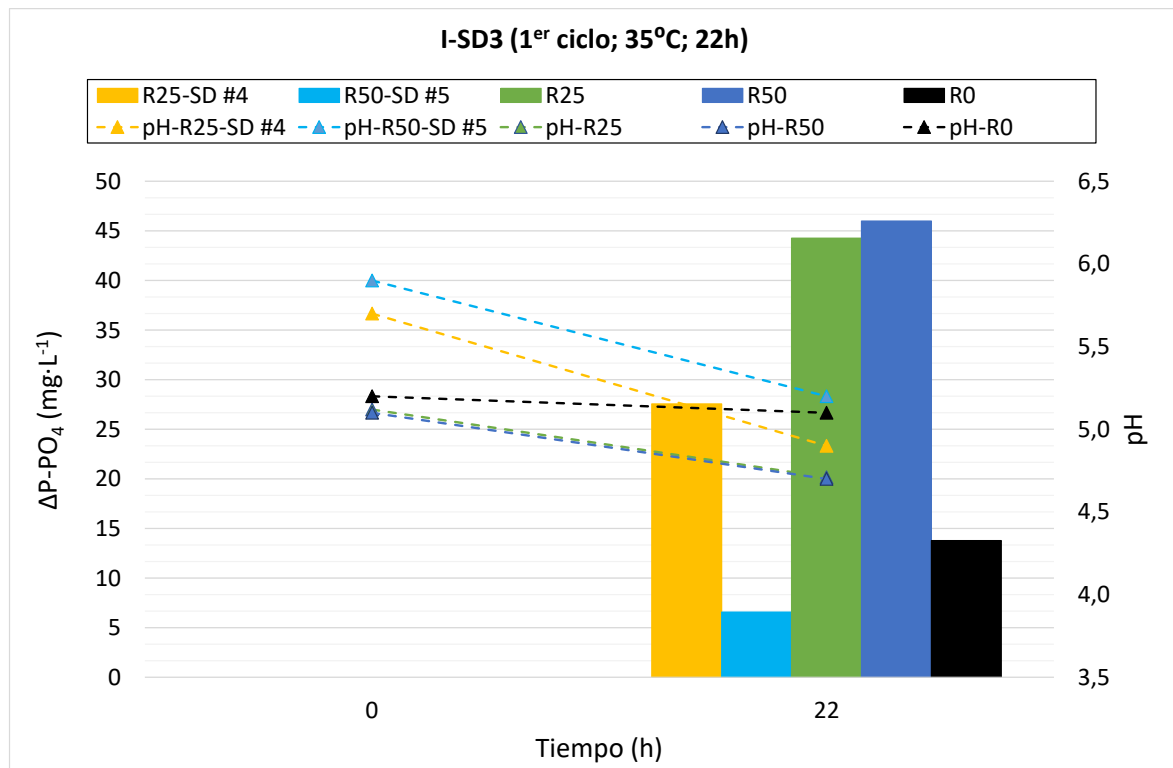


Figura 78. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en el primer ciclo de los ensayos I-SD3.

Estas diferencias también se evidencian en las condiciones iniciales del ensayo, donde se observaron concentraciones de P-PO₄ de 319 mg P·L⁻¹ en R25-SD #4 y 283 mg P·L⁻¹ en R50-SD #5 (Figura 79), valores considerablemente inferiores (especialmente en el caso de R50-SD #5) a los registrados en los reactores con enzima libre (374,2 mg P·L⁻¹ en R25 y 395 mg P·L⁻¹ en R50) y en el control sin enzima (352,4 mg P·L⁻¹ en R0). Este comportamiento puede estar relacionado con la ligera alcalinización inicial del medio inducida por el citosano, ya que los grupos aminos protonados del citosano tienen una carga positiva, con capacidad de interactuar electrostáticamente con las especies P-PO₄. Así, pueden atraer y retener las moléculas de P-PO₄ cargadas negativamente, favoreciendo su adsorción sobre la superficie del material encapsulante (Syeda et al., 2024), lo que podría explicar la menor concentración inicial de P-PO₄ observada en los reactores con enzima encapsulada.

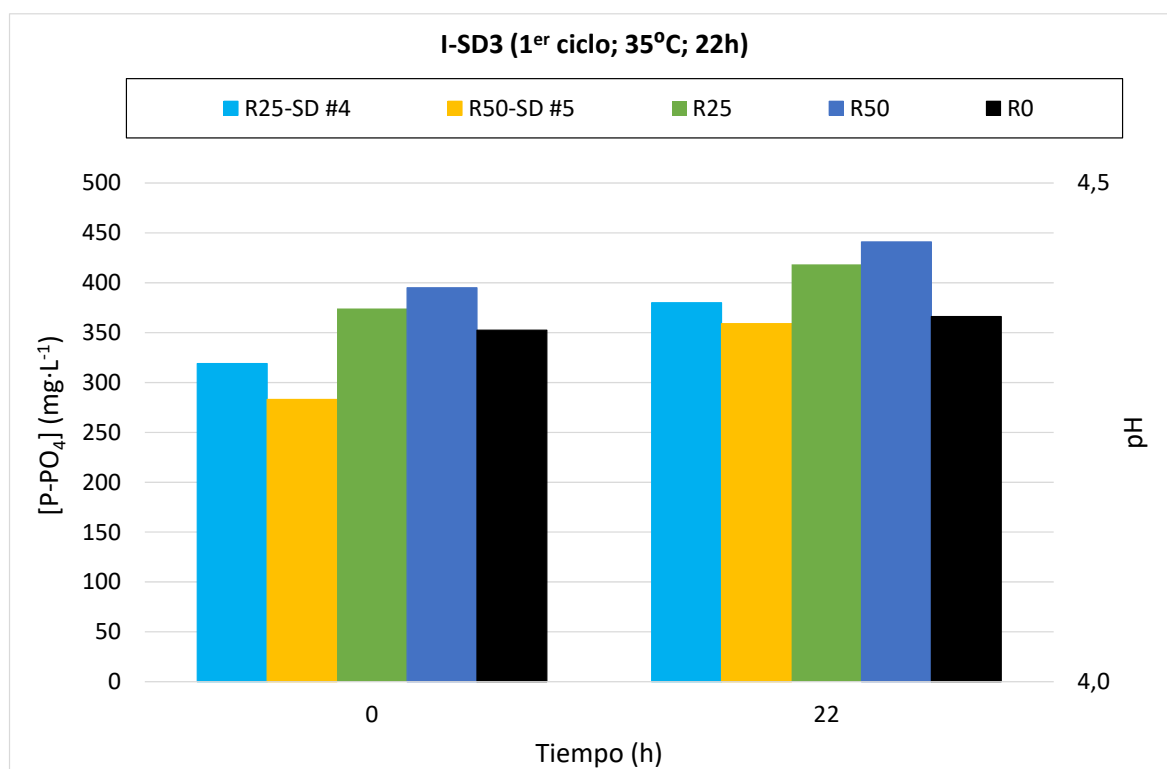


Figura 79. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en el primer ciclo de los ensayos I-SD3.

Tras 22 horas de operación, las concentraciones finales de P-PO₄ en los reactores con enzima encapsulada (R25-SD #4 y R50-SD #5) sugieren que parte del P-PO₄ inicialmente retenido podría haberse redissuelto, probablemente debido a la desorción del P-PO₄ previamente adsorbido sobre la matriz de citosano. Adicionalmente, no se descarta que dicha liberación esté asociada, al menos en parte, a la acción hidrolítica de la enzima encapsulada, cuya actividad queda enmascarada por los procesos de adsorción de P-PO₄ observados al inicio del ensayo.

En resumen, en este primer ciclo de ensayos I-SD3 se comprobó que los reactores con enzimas encapsuladas, R25-SD #4 y R50-SD #5, presentan un comportamiento diferenciado respecto a los de enzima libre y el control, tanto en términos de liberación de P-PO₄ como en la evolución del pH. La encapsulación con citosano parece inducir una retención inicial del P-PO₄, probablemente por fenómenos de adsorción y fomentar una ligera alcalinización inicial del medio.

Tras finalizar este primer ciclo, se recuperaron los productos encapsulados R25-SD #4 y R50-SD #5 mediante el tamizado del contenido de estos reactores para ser introducidos en un nuevo ciclo de

ensayos. Los productos recuperados se presentan en la Figura 80, observándose una consistencia pegajosa y bastante húmeda.

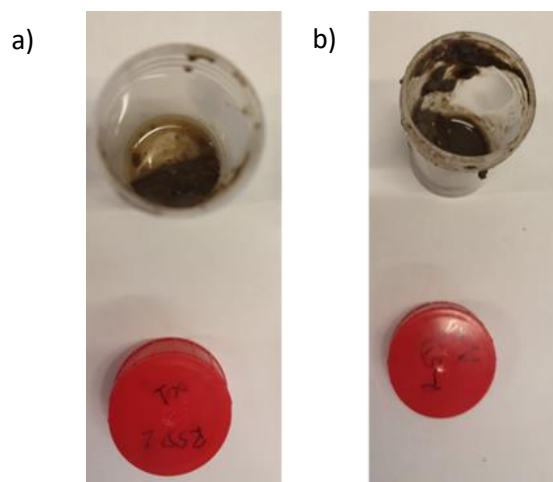


Figura 80. Productos recuperados: R25 SD#4 (a) y R50 SD#5 (b) recuperado tras el primer ciclo de ensayos.

En el **segundo ciclo** (Figura 81), los reactores con productos encapsulados no mostraron ninguna alteración significativa del pH al inicio del ensayo, con valores en torno a 5,2, similares a los observados en los reactores con enzima libre (R25 y R50) y sin enzima (R0). Esto indica que el material encapsulado ya no tuvo ningún impacto adicional sobre el medio, lo que sugiere que las posibles interacciones físico-químicas iniciales ya se habían agotado en el primer ciclo.

Durante las 22 horas del segundo ciclo, se cuantificó la liberación acumulada de $P\text{-PO}_4$ como medida del rendimiento de los distintos sistemas. Los resultados mostraron que los productos encapsulados mantenían una actividad hidrolítica relevante: se liberaron $88,5 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R25-SD#4 y $84,0 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R50-SD#5. Estos valores superaron ampliamente al control sin enzima ($33,4 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R0) y fueron similares a los sistemas con enzima libre ($80,2 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R25 y $89,0 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en R50). Así, a pesar de haber sido reutilizados, los productos encapsulados con citosano demostraron una buena estabilidad funcional, siendo capaces de liberar P en proporciones comparables a las de la fitasa libre.

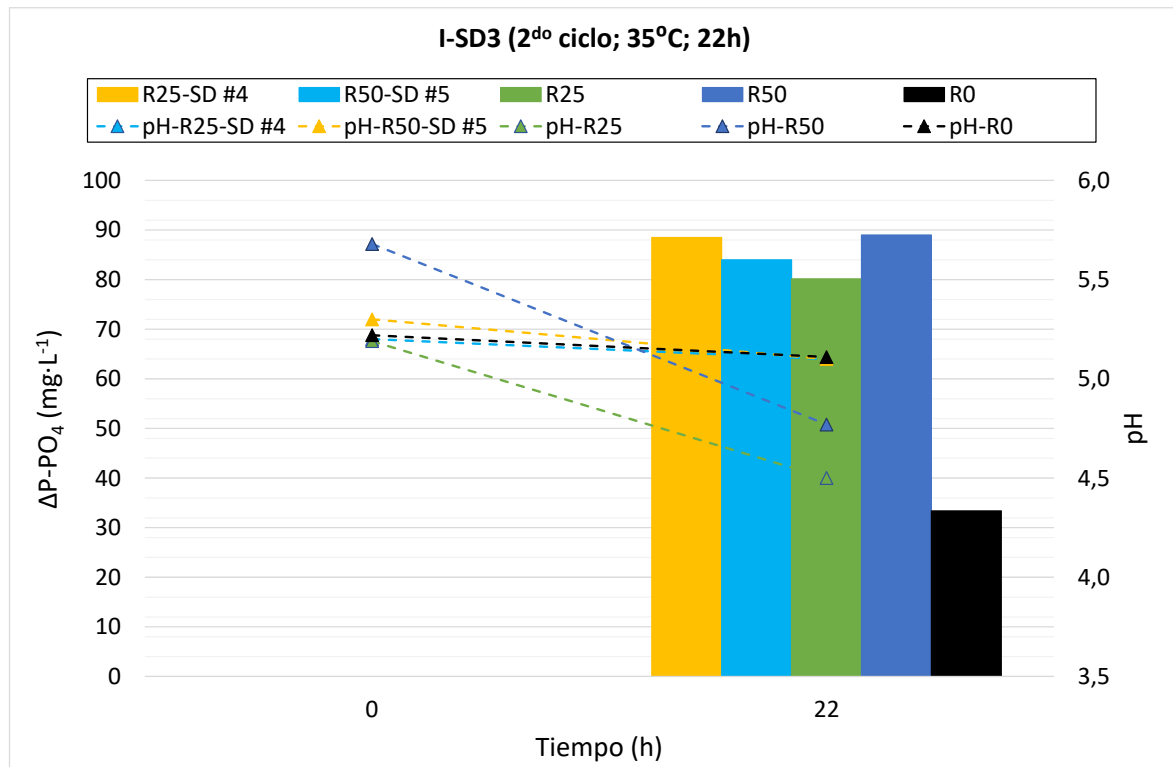


Figura 81. Evolución de la acumulación de P-PO₄ en el segundo ciclo de los ensayos I-SD3.

Finalmente, en este segundo ciclo, el pH de los reactores con enzima encapsulada se mantuvo prácticamente constante o con descensos leves, mientras que los reactores con enzima libre mostraron caídas más pronunciadas: de 5,2 a 4,5 en R25 y de 5,7 a 4,8 en R50. Estos resultados reflejan que, aunque la enzima encapsulada logró mantener su actividad, la matriz de citosano actuó como un amortiguador parcial frente a la acidificación del medio. Esta capacidad de moderar el descenso del pH podría representar una ventaja en aplicaciones reales, ya que permite mantener el entorno de reacción más próximo al pH óptimo de actividad de las fitasas (en torno a 5,5–6), favoreciendo así su eficiencia catalítica y estabilidad durante el proceso.

Tras finalizar el segundo ciclo, no se logró recuperar producto encapsulado de los reactores, por lo que a continuación se abordan directamente los aspectos relacionados con la eficacia del proceso y otros parámetros evaluados.

En la Tabla 38 se presentan los datos más relevantes tanto del sustrato con el que se realizaron los distintos ciclos de ensayo, como los parámetros que permiten determinar el rendimiento del

proceso. Es importante señalar que en esta tabla no se incluyen los datos correspondientes al primer ciclo de ensayos I-SD3, debido a las interferencias observadas por fenómenos de adsorción inicial de $P-PO_4$ en los reactores con enzima encapsulada, ya comentadas anteriormente. Las liberaciones netas fueron de 55 mg $P \cdot L^{-1}$ en R25-SD#4 y 51 mg $P \cdot L^{-1}$ en R50-SD#5, con eficacias de 12,6 % y 11,6 %, respectivamente. Estos resultados son muy similares a los obtenidos con la enzima libre: 47 mg $P \cdot L^{-1}$ en R25 (10,7 %) y 56 mg $P \cdot L^{-1}$ en R50 (12,8 %). Este comportamiento refleja que, una vez superadas las posibles interacciones iniciales entre el citosano y el medio, la enzima encapsulada mantuvo una actividad hidrolítica comparable a la de la enzima libre.

Tabla 38. Descripción de los ensayos I-SD2: ciclos, características del fango y resultados experimentales.

Ensayos	Nº ciclo	Reactor	P_T	$P-PO_4$	P_{org} disponible	P_{org} hidrolizado	$\Delta P-PO_4$ ENZIMA	Eficacia
			mg $P \cdot L^{-1}$	mg $P \cdot L^{-1}$	mg $P \cdot L^{-1}$	%	mg $P \cdot L^{-1}$	%
I-SD2	2	R25	827	391,1	436	47	47	10,7
		R50					56	12,8
		R25-SD #4					55	12,6
		R50-SD #5					51	11,6

En resumen, los ensayos I-SD3 demostraron que las encapsulaciones en citosano (R25-SD #4 y R50-SD #5) influye en la liberación de $P-PO_4$, especialmente en el primer ciclo, donde se observaron interferencias iniciales debidas a fenómenos de adsorción. Sin embargo, en el segundo ciclo, al reutilizar los encapsulados, dichas interferencias desaparecieron, permitiendo que la actividad de la enzima encapsulada se igualara a la de la enzima libre. Estos resultados evidencian que, superada la fase inicial de interacción entre el encapsulante y el medio, este tipo de encapsulación permitió reutilizar el producto en un segundo ciclo, alcanzando unas eficacias significativas del proceso, lo que representa una ventaja operativa importante en términos de sostenibilidad y coste.

4.1.9.3. MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN EN MASA

Para la realización de estos ensayos se utilizaron los hidrogeles elaborados siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.9.3. El producto final obtenido se presenta en la Figura 82, muestra un aspecto compacto, translúcido y homogéneo, con una consistencia gelatinosa y flexible.

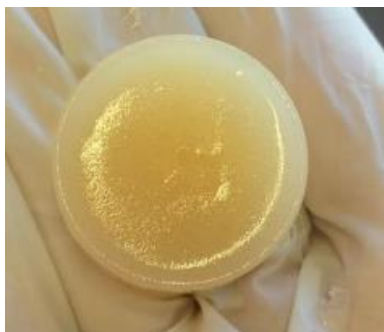


Figura 82. Producto obtenido: R25 PM #1.

Dado el buen aspecto, la estructura definida y la estabilidad física de los hidrogeles obtenidos, se consideró oportuno validar previamente su funcionalidad en condiciones controladas, antes de aplicarlos en matrices reales más complejas. Para ello, se diseñaron ensayos preliminares utilizando un patrón comercial de ácido fítico como sustrato modelo, lo que permitió evaluar la actividad enzimática de las formulaciones encapsuladas en un entorno libre de interferencias derivadas de la matriz del fango. El uso de ácido fítico como sustrato modelo facilita un análisis más directo, reproducible y cuantificable de la eficiencia de la encapsulación, así como de la estabilidad térmica y la vida útil de las enzimas inmovilizadas a lo largo de múltiples ciclos de uso. Esta estrategia experimental no solo permitió comprobar la eficacia inicial de la inmovilización, sino también su desempeño sostenido en el tiempo.

Una vez validada la viabilidad de estas formulaciones en los ensayos con patrón (I-PO1), se procedió a su aplicación en muestras reales de fango mezcla procedentes de la EDAR de Calahorra (ensayos I-PO2), evaluando su desempeño en condiciones reales y con un sustrato complejo. La Tabla 39 recoge la nomenclatura empleada y las características principales de los ensayos enzimáticos llevados a cabo con estas formulaciones encapsuladas.

Para los **ensayos I-PO1**, se evaluó el comportamiento del hidrogel R25-PM #1 a lo largo de seis ciclos consecutivos de operación, utilizando como sustrato un patrón de ácido fítico, en lugar del fango mezcla proveniente de la EDAR de Calahorra empleado en los ensayos I-PO1.

Tabla 39. Nomenclatura y características de los ensayos correspondientes al lote “I”-método de polimerización en masa.

Ensayos	Nomenclatura Producto enzimático encapsulado	Sustrato utilizado	Nº Ciclos – Nomenclatura específica del ensayo
I-PO1	R25-PM #1	Patrón de ácido fítico	<i>6 ciclos</i>
I-PO2	R25-PM #1	Fango mezcla	<i>1^{er} ciclo – I1 2^{do} ciclo – I2</i>

En la Tabla 40 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos I-PO1, cuyos cálculos se realizaron conforme a lo indicado en el apartado 3.5.

Los resultados muestran que, en todos los ciclos, el reactor control (R0_patrón, sin adición de enzima) mantuvo una concentración inicial y final de P-PO₄ constante, confirmando la ausencia de liberación espontánea del P orgánico en el patrón utilizado. En contraste, el reactor con enzima encapsulada mostró una liberación neta de P-PO₄ elevada desde el primer ciclo, con un valor inicial de 275 mg P·L⁻¹ y una eficacia del 83,3%. A partir del segundo ciclo, se observó una ligera disminución progresiva en la liberación neta de P-PO₄. Esta disminución se acentuó en los ciclos tercero y cuarto, con eficacias de 71,8% y 68,8%, respectivamente, lo que sugiere una pérdida progresiva de rendimiento posiblemente debida a la difusión parcial del enzima fuera de la matriz, a fenómenos de inactivación, o a una saturación parcial de sitios activos del sustrato.

Tabla 40. Descripción de los ensayos I-PO1: ciclos, características del fango y resultados experimentales.

Ensayos	Nº ciclo	Reactor	P-PO ₄		ΔP-PO ₄ mg P·L ⁻¹	Eficacia
			0h	22h		%
			mg P·L ⁻¹			
I-PO1	1	R0_patrón	20	20	0	-
		R25-PM #1_patrón	20	295	275	83,3
	2	R0_patrón	18	16	-2	-
		R25-PM #1_patrón	18	266	248	75,2
	3	R0_patrón	17	17	0	-
		R25-PM #1_patrón	17	254	237	71,8
	4	R0_patrón	15	15	0	-
		R25-PM #1_patrón	15	242	227	68,8
	5	R0_patrón	12	12	0	-
		R25-PM #1_patrón	12	249	237	71,8
	6	R0_patrón	13	13	0	-
		R25-PM #1_patrón	13	250	237	71,8

En conjunto, los ensayos I-PO1 confirman que los soportes de hidrogel no comprometen la actividad de la enzima y que, dentro del tiempo ensayado (22 horas/ciclo), esta es capaz de alcanzar eficacias muy elevados y, lo que es más importante, constantes a lo largo de los distintos ciclos. Cabe destacar

que, tras seis ciclos, los soportes se mantenían prácticamente íntegros (Figura 83), lo cual representa una ventaja significativa para su recuperación en condiciones de reacción más exigentes, como las que se dan en la cámara de fangos de mezcla de una EDAR.



Figura 83. Hidrogeles recuperados tras 6 ciclos de uso en los ensayos I-PO2.

Para los **ensayos I-PO2**, que no se llevaron a cabo en paralelo con ninguno de los lotes previamente caracterizados (S, M o C), fue necesario realizar una caracterización físico-química específica tanto del fango mezcla empleado como sustrato como del cóctel enzimático de fitasas utilizado. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 41 y Tabla 42.

Tabla 41. Caracterización físico-química del fango mezcla utilizado como sustrato en los ensayos I-PO1.

Ensayos	ST	P-PO₄	P_T	pH
	<i>mg·L⁻¹</i>	<i>mg·L⁻¹</i>	<i>mg·L⁻¹</i>	-
I1	39.834	402	780	5,9
I2	48.300	327	886	6,6

Tabla 42. Caracterización físico-química de las enzimas fitasas utilizadas en los ensayos I-PO1.

ST	P_T	P-PO₄	DQO	pH
<i>mg·L⁻¹</i>	<i>mg·L⁻¹</i>	<i>mg·L⁻¹</i>	<i>mg·L⁻¹</i>	-
627.560	1.254	1.130	832.000	4,3

El fango mezcla presenta concentraciones elevadas de ST, con valores entre 39.834 mg·L⁻¹ y 48.300 mg·L⁻¹, así como una carga de P_T comprendida entre 780 mg·L⁻¹ y 886 mg·L⁻¹. Estos valores de P_T se consideran intermedios respecto a los observados en los ensayos del lote “M”.

En cuanto al cóctel enzimático, su caracterización muestra resultados consistentes con los ya observados en los ensayos enzimáticos previos de los lotes “S” y “M”, lo que confirma su estabilidad y homogeneidad a lo largo del tiempo de trabajo experimental.

En el primer ciclo de los ensayos I-PO2 (ver Figura 84), se alcanzaron liberaciones acumuladas de $P-PO_4$ tras 22 horas de operación de $176 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en el reactor con el producto encapsulado R25-PM #1, $145 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en el reactor con enzima libre (R25) y $114 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ en el control sin adición de enzima (R0). Estos resultados muestran una mayor eficacia del producto encapsulado frente a la enzima libre y, especialmente, respecto al control.

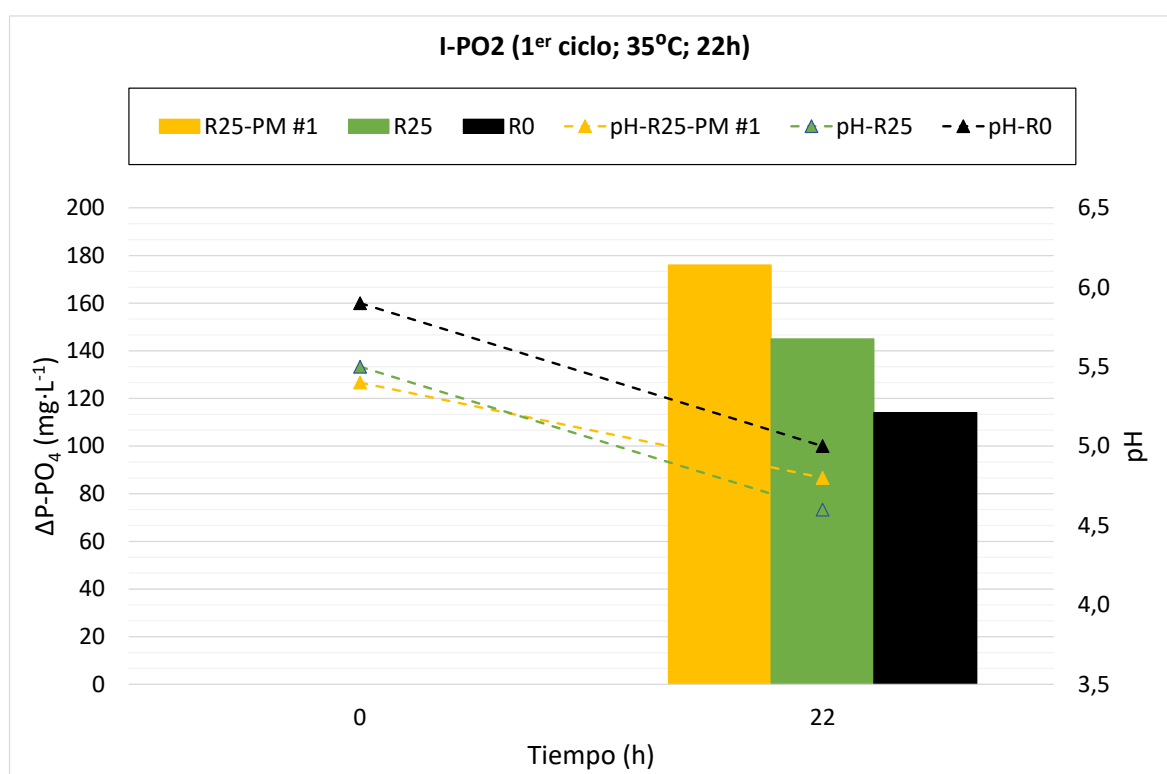


Figura 84. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en el primer ciclo de los ensayos I-PO2.

A nivel de pH, se observó un descenso en todos los sistemas con actividad enzimática: en R25-PM #1 el pH disminuyó de 5,4 a 4,8, en R25 bajó de 5,5 a 4,6, mientras que en el control la variación fue menos pronunciada (de 5,9 a 5,0). Esta tendencia confirma la actividad de las enzimas fitasas y las bacterias acidogénicas durante el proceso, siendo el descenso de pH más moderado en el sistema encapsulado, posiblemente debido a una liberación enzimática más progresiva.

En el segundo ciclo (ver Figura 85), el producto encapsulado R25-PM #1 volvió a mostrar una liberación acumulada de $P-PO_4$ significativa (148 mg P L^{-1}), superando ligeramente a la enzima libre (139 mg P L^{-1}) y de forma más marcada al control sin enzima (129 mg P L^{-1}). Estos resultados indican que el producto encapsulado mantuvo su actividad enzimática. En cuanto al pH, las variaciones fueron de menor magnitud: R25-PM #1 pasó de 5,6 a 5,3; R25 de 5,5 a 4,8; y R0 de 6,6 a 5,6. Nuevamente, se observa una atenuación del descenso de pH en el sistema con enzima encapsulada, lo que refuerza la hipótesis de una acción más sostenida en el tiempo gracias al soporte.

Estos resultados en conjunto reflejan una buena estabilidad operativa del sistema encapsulado a lo largo de ambos ciclos, manteniendo una actividad comparable e incluso superior a la de la fitasa libre, al tiempo que amortigua los efectos de acidificación del medio.

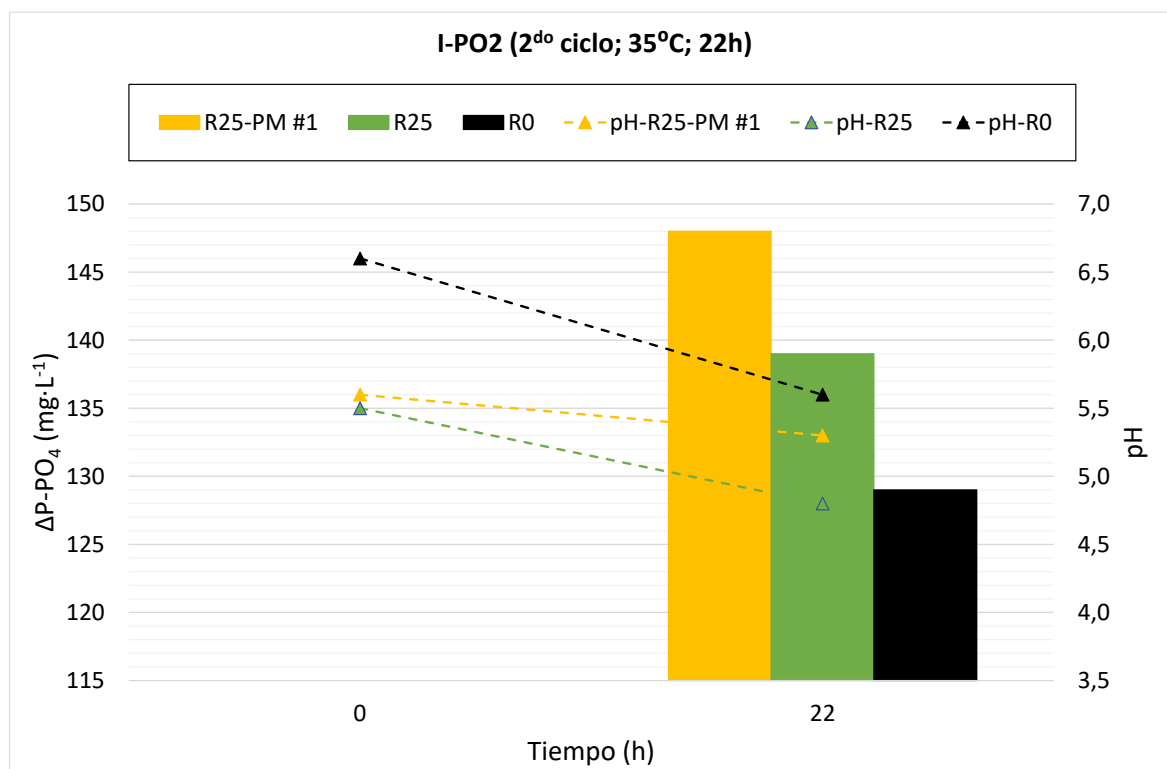


Figura 85. Evolución de la acumulación de $P-PO_4$ en el segundo ciclo de los ensayos I-PO1.

Cabe mencionar que el producto encapsulado fue sometido a un total de seis ciclos de ensayo. No obstante, los resultados obtenidos a partir del tercer ciclo (ciclos 3, 4, 5 y 6) no fueron concluyentes,

ni siquiera en los ensayos con enzima libre. Por este motivo, dichos resultados no se incluyen en el presente apartado.

En la Tabla 43 se presentan los parámetros clave empleados para evaluar la eficacia de la liberación de P inducida por la acción de las enzimas libres y encapsuladas durante los ensayos I-PO2, a lo largo de los dos ciclos realizados.

Tabla 43. Descripción de los ensayos I-PO2: ciclos, características del fango y resultados experimentales.

Ensayos	Nº ciclo	Reactor	P _T	P-PO ₄	P _{org} disponible	P _{org} hidrolizado	ΔP-PO ₄ ENZIMA	Eficacia
			mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	mg P·L ⁻¹	%	mg P·L ⁻¹	%
I-PO2	1	R25	780	402	378	52	31	8,2
		R25-PM #1					62	16,4
	2	R25	886	327	559	37	10	1,8
		R25-PM #1					19	3,4

En el primer ciclo de ensayo, la liberación neta de P-PO₄ registrada en el reactor con enzima libre (R25) fue de 31 mg P·L⁻¹, mientras que el reactor con producto encapsulado (R25-PM #1) llegó a un valor de 62 mg P·L⁻¹. En este último se alcanzó una eficacia de liberación de P-PO₄ del 16,4%, duplicando el resultado registrado en el reactor con la enzima en su forma libre (8,2%). Esta mejora sugiere que el formato encapsulado permitió una liberación más eficiente de la enzima o una mayor estabilidad de su actividad en el medio de reacción.

Durante el segundo ciclo, se observó una marcada reducción en la actividad enzimática respecto al ciclo anterior. La liberación neta de P-PO₄ fue de solo 10 mg P·L⁻¹ para la enzima libre (R25) y 19 mg P·L⁻¹ en el caso del producto encapsulado (R25-PM #1). Las eficacias obtenidas fueron del 1,8%

y 3,4%, respectivamente. Aunque los valores son sensiblemente más bajos que los observados en el primer ciclo, el producto encapsulado continuó mostrando un mejor desempeño que la forma libre, lo que podría deberse a una mayor resistencia de la matriz encapsulante frente a condiciones menos favorables del medio.

En conjunto, los resultados obtenidos en los ensayos I-PO2 respaldan la utilidad de la encapsulación mediante método de polimerización en masa como estrategia para mejorar la estabilidad operativa de las fitas en el proceso. A pesar de la disminución general en la actividad en el segundo ciclo, el sistema encapsulado mantuvo su superioridad frente a la enzima libre, lo que refuerza su potencial para aplicaciones donde se busca su reutilización. Esta ventaja, además de permitir una posible reducción en la cantidad de enzima necesaria, podría traducirse en beneficios económicos si se optimiza el proceso de encapsulación para aplicaciones a escala.

4.1.9.4. COMPARATIVA DE LAS DISTINTAS ENCAPSULACIONES REALIZADAS

La comparación de los productos encapsulados en términos de eficacia y liberación neta de P-PO₄ pone de manifiesto diferencias relevantes asociadas a la formulación, el método de secado y la proporción de citosano (CS) y crosslinker (TEOS, APTES o ninguno) utilizada.

Las formulaciones R25-PASTILLAS #1 y #2, obtenidas por secado natural con relaciones CS:TEOS de 3:1 y 1:1 respectivamente, presentaron el mejor rendimiento global, alcanzando hasta tres ciclos de operación con eficacias del proceso entre 12,2 % y 19,6 %. Este buen desempeño se atribuye a una estructura porosa y estable, que favoreció la difusión del sustrato y la liberación sostenida de la enzima.

En contraste, los productos R25-GEL #1 y #2, secados de forma forzada a 120 °C, mostraron una estabilidad estructural menor. Ambos productos generaron un aumento importante del pH inicial del medio (hasta 8,6–9,2), que se mantenía durante todo el ensayo, lo que probablemente indujo la precipitación del P-PO₄ y afectó negativamente la actividad de la enzima encapsulada. R25-GEL #1 (1:1) resistió dos ciclos y alcanzó una eficacia adecuada solo en el segundo (12,5 %), mientras que R25-GEL #2 (3:1) se desintegró tras el primero.

El producto R50-SD #1, preparado con TEOS como crosslinker y una relación CS:TEOS 1:1, aunque se obtuvo en cantidades reducidas, mostró un comportamiento inicial favorable, sin alteraciones significativas del pH y con eficacias de 6,8 % y 9,5 % en los dos primeros ciclos, respectivamente. Por otro lado, R50-SD #2 y R50-SD #3, formulados con APTES en proporciones CS:APTES 3:1 y 1:1, presentaron elevadas alcalinizaciones iniciales (pH 10,2–10,8), lo que habría reducido la solubilidad del P y enmascarado la actividad de la fitasa. Además, no fue posible recuperar el producto encapsulado para realizar ciclos posteriores.

En cuanto a los productos sin crosslinker, R25-SD #4 y R50-SD #5, ambos encapsulados únicamente con citosano, se registraron valores de pH iniciales ligeramente más altos durante el primer ciclo de ensayos. Esta alcalinización inicial podría estar relacionada con la liberación de grupos amina del citosano al medio, lo que, además, habría favorecido la adsorción del P-PO₄ en la superficie del material encapsulante, limitando su disponibilidad inicial. No obstante, en el segundo ciclo, una vez mitigadas estas interferencias, ambos sistemas mostraron una liberación de P más favorable y eficacias de proceso aceptables, lo que evidencia el potencial de reutilización de estos productos encapsulados.

Por último, en los ensayos con fango mezcla utilizando el producto encapsulado mediante polimerización en masa (I-PO2), la formulación R25–PM #1 logró una eficacia del 16,4% en un primer ciclo. En el segundo, se registró una reducción en la actividad enzimática, obteniéndose una eficacia del 3,4%. No obstante, es destacable la estabilidad estructural de la matriz, que se mantuvo prácticamente intacta entre ambos ciclos, lo que subraya su resistencia física.

En resumen, los resultados indican que la formulación más prometedora es la obtenida mediante encapsulación por sol-gel, utilizando TEOS como crosslinker, a dosis R25 y con secado natural en forma de pastilla (I-SG1). Esta opción destacó por su mayor eficacia en la liberación de P-PO₄, buena estabilidad estructural y capacidad de reutilización en ciclos sucesivos. En cambio, las formulaciones en gel y spray drying mostraron baja estabilidad y sensibilidad al pH, mientras que la polimerización en masa produjo una matriz resistente con buena eficacia inicial, pero con notable caída de actividad en el segundo ciclo.

4.2. SIMULACIÓN DEL PROCESO

Con el objetivo de simular tanto el funcionamiento actual como distintos escenarios alternativos para maximizar la recuperación de P en etapas previas a la digestión anaerobia en la EDAR de Calahorra, se llevaron a cabo varias fases de trabajo. Estas incluyeron la caracterización del agua residual, la calibración y validación del modelo BNRM2, y el análisis de escenarios orientados a la recuperación de P. Estos escenarios se diseñaron considerando dos enfoques: sin adición de enzimas hidrolíticas (SIN hidrólisis enzimática) y con adición de enzimas hidrolíticas (CON hidrólisis enzimática), permitiendo así evaluar el impacto potencial del pretratamiento enzimático sobre la liberación de P y su posterior recuperación.

En los apartados siguientes se detallan los resultados obtenidos en cada una de estas fases.

4.2.1. RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO BNRM2

Con el fin de disponer de una base sólida para la simulación, se contó con dos campañas exhaustivas de caracterización de las corrientes principales de la EDAR de Calahorra. La primera fue llevada a cabo por la EDAR de Calahorra en octubre de 2018, y la segunda por el grupo CALAGUA en diciembre de 2019. Estos estudios permitieron conocer en detalle las características del agua de entrada y de las distintas corrientes internas de la planta, sirviendo como referencia para la calibración y validación del modelo BNRM2.

4.2.1.1. CALIBRACIÓN DEL MODELO BNRM2

A partir de los datos de la primera campaña de caracterización (ver Tabla 44), se realizó la **calibración inicial del modelo**, ajustando los principales parámetros cinéticos y estequiométricos que permiten reproducir con precisión el comportamiento de la EDAR.

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.11, y a partir de los resultados de la Tabla 44, se determinaron las características del agua residual afluente según el modelo BNRM2, utilizando las ecuaciones comprendidas entre la (Ec. 10) y la (Ec. 19). Así mismo, se calcularon los factores estequiométricos correspondientes mediante las ecuaciones de la (Ec. 20) a la (Ec. 26).

Tabla 44. Características del agua residual afluyente (octubre 2018).

Parámetro	Unidades	Valor
Caudal	$\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$	12.887
SST	$\text{mg SST} \cdot \text{L}^{-1}$	269
SSV	$\text{mg SSV} \cdot \text{L}^{-1}$	230
%SSV	%	85
DQO _T	$\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$	786
DQO ₅	$\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$	275
DBO ₅	$\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$	482
DBO _{5,S}	$\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$	169
DBO _T	$\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$	614
DBO ₅	$\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$	215
AGV	$\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$	80
ALK	$\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$	250
N _T	$\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$	42,9
N _{T,S}	$\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$	23,5
N-NH ₄	$\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$	22,3
P _T	$\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$	4,8
P _{T,S}	$\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$	2,8
P-PO ₄	$\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$	2,1
Temperatura	°C	19,3
pH	-	7,1

La Tabla 45 recoge los parámetros del agua afluyente obtenidos mediante este enfoque, mientras que en la Tabla 46 se presentan los valores empleados para los factores estequiométricos.

A partir de esta caracterización, se procedió a la calibración del modelo BNRM2, mediante el ajuste de un conjunto de parámetros estequiométricos y cinéticos que permitían reproducir el funcionamiento de cada unidad operativa de la EDAR: decantación primaria, reactor de fangos activados, espesado de fangos, digestión anaerobia y deshidratación de fango digerido. La Tabla 47 muestra los valores de los parámetros estequiométricos correspondientes a los microorganismos implicados en el reactor de fangos activados de la línea de aguas fijados durante la calibración de la EDAR.

Tabla 45. Características del agua residual afluyente en función del modelo BNRM2 (octubre 2018).

Parámetro	Unidades	Valor
S _F	mg DQO·L ⁻¹	187
S _A	mg DQO·L ⁻¹	80
S _{PRO}	mg DQO·L ⁻¹	0
S _I	mg DQO·L ⁻¹	8
S _{NH4}	mg N·L ⁻¹	22,3
S _{NO3}	mg N·L ⁻¹	0,7
S _{NO2}	mg N·L ⁻¹	0
S _{PO4}	mg P·L ⁻¹	2,1
S _{ALK}	mg CaCO ₃ ·L ⁻¹	252
X _I	mg DQO·L ⁻¹	164
X _S	mg DQO·L ⁻¹	347
X _{NV}	mg SST·L ⁻¹	40
X _H	mg DQO·L ⁻¹	0
X _{AUT}	mg DQO·L ⁻¹	0
X _{PAO}	mg DQO·L ⁻¹	0
X _{PP}	mg DQO·L ⁻¹	0
X _{PHA}	mg DQO·L ⁻¹	0
X _{ACID}	mg DQO·L ⁻¹	0
X _{MAC}	mg DQO·L ⁻¹	0
X _{MH2}	mg DQO·L ⁻¹	0
X _{TSS}	mg SST·L ⁻¹	269

Tabla 46. Valores de los factores estequiométricos para el agua afluyente (octubre 2018).

Parámetro	Unidad	Valor
Nitrógeno:		
i _{NSI}	g N·g ⁻¹ DQO	0,00001
i _{NSF}	g N·g ⁻¹ DQO	0,00262
i _{NXI}	g N·g ⁻¹ DQO	0,07500
i _{NXS}	g N·g ⁻¹ DQO	0,02047
i _{NBM}	g N·g ⁻¹ DQO	0,07000
Fósforo:		
i _{PSI}	g P·g ⁻¹ DQO	0,00010
i _{PSF}	g P·g ⁻¹ DQO	0,00374
i _{PXI}	g P·g ⁻¹ DQO	0,00010
i _{PXS}	g P·g ⁻¹ DQO	0,00572

Parámetro	Unidad	Valor
i_{PBM}	$g\ P \cdot g^{-1}\ DQO$	0,02000
Sólidos suspendidos totales		
i_{SSTXI}	$g\ SST \cdot g^{-1}\ DQO$	0,48000
i_{SSTXS}	$g\ SST \cdot g^{-1}\ DQO$	0,43220
i_{SSTBM}	$g\ SST \cdot g^{-1}\ DQO$	0,70000

Tabla 47. Valores de los parámetros estequiométricos correspondientes a las bacterias del sistema de fangos activados utilizados en la calibración del modelo.

Parámetro	Unidad	Valor
Hidrólisis		
f_{SI}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,0
Bacterias heterótrofas		
Y_H	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,63
f_{XI}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,10
Bacterias acumuladoras de polifosfatos (PAO)		
Y_{PAO}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,63
Y_{PO4}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ P$	0,40
Y_{PHA}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,20
f_{XI}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,10
Bacterias autótrofas		
Anammox		
Y_{ANA}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ N$	0,16
f_{XI}	$g\ DQO \cdot g\ DQO^{-1}$	0,10
Amoniooxidantes		
Y_{AMM}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ N$	0,17
f_{XI}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,10
Nitritooxidantes		
Y_{NIT}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ N$	0,07
f_{XI}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,10
Hidrólisis acidogénicas		
f_{SI}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,05
Bacterias acidogénicas		
Y_{ACID}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,15
f_{XI}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,20
f_{AC}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,58
f_{PRO}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,25

A su vez, la Tabla 48 muestra los valores utilizados en la calibración del modelo para los parámetros cinéticos de los microorganismos implicados en el reactor de fangos activados.

Tabla 48. Valores de los parámetros cinéticos correspondientes a las bacterias de la línea de aguas utilizados en la calibración del modelo.

Parámetro	Unidad	Valor a 20°C
<i>Hidrólisis</i>		
K_h	d^{-1}	3,0
η_{NO_3}	-	0,60
η_{fe}	-	0,10
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_{NO_3}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,50
K_X	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	0,10
<i>Bacterias heterótrofas</i>		
μ_H	d^{-1}	6,0
η_{NO_3}	-	0,60
b_H	d^{-1}	0,40
K_{O_2}	$g\ O_2\ m^{-3}$	0,20
K_F	$g\ DQO\ m^{-3}$	4,0
K_A	$g\ DQO\ m^{-3}$	4,0
K_{PRO}	$g\ DQO\ m^{-3}$	4,0
K_{NO_3}	$g\ N\ m^{-3}$	0,50
K_{NH_4}	$g\ N\ m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P\ m^{-3}$	0,01
<i>Bacterias acumuladoras de polifosfatos (PAO)</i>		
q_{PHA}	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ PAO\ d^{-1}$	3,0
q_{PP}	$g\ PP \cdot g^{-1}\ PAO\ d^{-1}$	1,50
μ_{PAO}	d^{-1}	1,0
η_{NO_3}	-	0,40
b_{PAO}	d^{-1}	0,15
b_{PP}	d^{-1}	0,15
b_{PHA}	d^{-1}	0,15
K_{O_2}	$g\ O_2\ m^{-3}$	0,20
K_A	$g\ DQO\ m^{-3}$	4,0
K_{PRO}	$g\ DQO\ m^{-3}$	4,0
K_{NH_4}	$g\ N\ m^{-3}$	0,05
K_{PS}	$g\ P\ m^{-3}$	0,20

Parámetro	Unidad	Valor a 20°C
K _P	g P · m ⁻³	0,01
K _{PP}	g PP · g ⁻¹ PAO	0,02
K _{MAX}	g PP · g ⁻¹ PAO	0,34
K _{I PP}	g PP · g ⁻¹ PAO	0,01
K _{PHA}	g PHA · g ⁻¹ PAO	0,01
<i>Bacterias autótrofas</i>		
<i>Amoniooxidantes</i>		
μ _{AMM}	d ⁻¹	1,0
b _{AMM}	d ⁻¹	0,15
K _{O2}	g O ₂ · m ⁻³	0,52
K _{NH4}	g N · m ⁻³	0,54
K _P	g P · m ⁻³	0,01
<i>Nitritooxidantes</i>		
μ _{NIT}	d ⁻¹	0,50
b _{NIT}	d ⁻¹	0,075
K _{O2}	g O ₂ · m ⁻³	0,67
K _{NH4}	g N · m ⁻³	0,01
K _P	g P · m ⁻³	0,01
<i>Hidrólisis acidogénicas</i>		
K _H	d ⁻¹	43,0
K _X	g DQO · gDQO ⁻¹	150,0
K _{O2}	g O ₂ · m ⁻³	0,20
<i>Bacterias acidogénicas</i>		
μ _{ACID}	d ⁻¹	1,28
b _{ACID}	d ⁻¹	0,33
K _F	g DQO · m ⁻³	15,0
K _{O2}	g O ₂ · m ⁻³	0,20
K _A	g DQO · m ⁻³	6500
K _{NH4}	g N · m ⁻³	0,05
K _P	g P · m ⁻³	0,01

La Tabla 49 se muestran los valores de la constantes de temperatura (Θ) utilizados.

Tabla 49. Valores de la constante de temperatura correspondientes a las bacterias de la línea de aguas utilizados en la calibración del modelo.

Bacterias	Valor Θ
Heterótrofas	1,072
Autótrofas	1,111
PAO	1,041
Acidogénicas	1,071

En paralelo, para el correcto funcionamiento del modelo en su conjunto, fue necesario definir también los parámetros del modelo de sedimentación aplicable a los decantadores secundarios. La Tabla 50 recoge los valores de los parámetros empleados en el modelo de sedimentación aplicado a los decantadores secundarios, seleccionados dentro de los intervalos típicos para EDAR urbanas (Barat et al., 2013).

Tabla 50. Valores de los parámetros de sedimentación de los decantadores secundarios utilizados en la calibración del modelo.

Parámetro	Valor Utilizado
IVF ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)	250
V_0 ($\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	119
$V_{S\text{max}}$ ($\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	150
r_h ($\text{m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,000813
r_p ($\text{m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,0050
f_{ns}	0,00050

En la Tabla 51 y Tabla 52 se muestran los valores de los parámetros estequiométricos y cinéticos, respectivamente, fijados durante la calibración correspondientes a los microorganismos implicados en la digestión anaerobia.

Tabla 51. Valores de los parámetros estequiométricos correspondientes a los microorganismos de la digestión anaerobia utilizados en la calibración del modelo.

Parámetro	Unidad	Valor
Hidrólisis acidogénicas		
f_{SI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,05
Bacterias acidogénicas		
Y_{ACID}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,15
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
f_{AC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,58
f_{PRO}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,25
Bacterias acetogénicas		
Y_{PRO}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,05
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
f_{AC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,57
Metanogénicas acetotróficas		
Y_{MAC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,025
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
Metanogénicas hidrogenotróficas		
Y_{MH2}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,045
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
Metanogénicas hidrogenotróficas		
Y_{MH2}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,045
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20

Cabe comentar que los valores de los distintos parámetros calibrados del modelo biológico (tanto para la línea de aguas como para la línea de fangos) y de sedimentación se encuentran dentro del intervalo de valores típicos para aguas residuales urbanas (Barat et al., 2013).

Tabla 52. Valores de los parámetros cinéticos correspondientes a los microorganismos de la digestión anaerobia utilizados en la calibración del modelo.

Parámetro	Unidad	Valor a 20°C
Hidrólisis acidogénicas		
K_H	d^{-1}	43,0
K_X	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	150
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
Bacterias acidogénicas		
μ_{ACID}	d^{-1}	1,77
b_{ACID}	d^{-1}	0,33
K_F	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	15
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_A	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	6500
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P \cdot m^{-3}$	0,01
Bacterias acetogénicas		
μ_{PRO}	d^{-1}	0,18
b_{PRO}	d^{-1}	0,03
K_{PRO}	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	10
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_{H_2}	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	0,60
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P \cdot m^{-3}$	0,01
Metanogénicas acetotróficas		
μ_{MAC}	d^{-1}	0,11
b_{MAC}	d^{-1}	0,03
K_A	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	30
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P \cdot m^{-3}$	0,01
Metanogénicas hidrogenotróficas		
μ_{MH_2}	d^{-1}	0,55
b_{MH_2}	d^{-1}	0,11
K_{H_2}	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	0,6
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,2
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P \cdot m^{-3}$	0,01

A continuación, en la Tabla 53 y Tabla 54 se comparan los valores simulados, empleando los parámetros cinéticos y estequiométricos calibrados (Tabla 47, Tabla 48, Tabla 50, Tabla 51 y Tabla 52), con los valores experimentales correspondientes para algunas de las corrientes más

representativas del sistema como son el efluente de la EDAR y la salida del digestor anaerobio. Esta misma comparativa puede verse para el resto de las unidades de la EDAR en el Anejo 7.1.

Efluente de la EDAR

En la Tabla 53 se comparan los valores simulados para la corriente efluente de la EDAR (salida de decantación secundaria) con los valores experimentales para esta corriente obtenidos en caracterización de octubre de 2018.

Tabla 53. Resultados de la calibración del modelo con respecto al efluente de la EDAR junto con los valores experimentales de octubre de 2018.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Efluente		
SST ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	2	5
SSV (%)	83	80
Eliminación SST (%)	99	97
DQO _T ($\text{mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$)	20	18
Eliminación DQO _T (%)	98	97
DQO _s ($\text{mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$)	9	17
DBO ₅ ($\text{mg DBO}\cdot\text{L}^{-1}$)	3	21
DBO _{5, s} ($\text{mg DBO}\cdot\text{L}^{-1}$)	1	20
N-NH ₄ ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	<0,1	0,6
Eliminación N-NH ₄ (%)	99	98
N _T ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	3,9	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,5	0,1
Eliminación P-PO ₄ (%)	84	96
P _T ($\text{mg P}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,8	0,3
pH	7,6	n.d.
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	239	n.d.

Como se puede observar en la Tabla 53, los rendimientos de eliminación de materia orgánica y sólidos suspendidos alcanzados en la EDAR (en torno al 97%) han sido reproducidos en la simulación. Por lo que respecta a la eliminación de nutrientes, los datos experimentales indican que en el caso del N se consigue un rendimiento de eliminación de N-NH₄ del 98%, mientras que en el caso de la eliminación

de P-PO₄ se alcanza un porcentaje del 96%. El rendimiento de eliminación de N-NH₄ se reproduce adecuadamente en el modelo calibrado, mientras que en el caso de la eliminación de P se alcanza un porcentaje de eliminación algo menor. No obstante, las concentraciones simuladas y experimentales de N-NH₄ y de P-PO₄ son similares.

Digestión anaerobia

La Tabla 54 muestra los principales resultados de calibración y los valores experimentales referentes al fango digerido y al biogás generado.

Tabla 54. Resultados de la calibración del modelo con respecto a la digestión anaerobia junto con los valores experimentales de octubre de 2018.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango digerido		
SST (mg·L ⁻¹)	25.454	22.800
Eliminación SST (%)	34	55
SSV (%)	75	69
Eliminación SSV (%)	41	58
DQO (mg DQO·L ⁻¹)	38.320	n.d.
DQO _s (mg DQO·L ⁻¹)	3.321	n.d.
AGV (mg DQO·L ⁻¹)	27	160
N-NH ₄ (mg N·L ⁻¹)	1.048	976
P-PO ₄ (mg P·L ⁻¹)	374	45,2
P _T (mg P·L ⁻¹)	467	610
pH	6,5	7,5
Alcalinidad (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)	1.750	3.750
Biogás		
Caudal (Nm ³ ·d ⁻¹)	1.649	1.277
% CH ₄	59,9	n.d.
% H ₂	0	n.d.
% CO ₂	39,8	n.d.
% H ₂ S	0,2	n.d.

Los resultados mostrados en la Tabla 54 indican un porcentaje simulado de eliminación de sólidos volátiles inferior al experimental. Sin embargo, según los históricos que se tienen del proceso de digestión de la EDAR de Calahorra, este valor estaría alrededor de un 45% que se encontraría más

parejo al simulado. El caudal de biogás generado en el proceso anaerobio presenta una buena concordancia con el valor experimental.

Respecto a las concentraciones de N-NH_4 y P-PO_4 cabe mencionar que, en el proceso de digestión, la muerte de las bacterias unido a la hidrólisis de la materia orgánica suspendida provoca la liberación de grandes cantidades de estos nutrientes, alcanzándose concentraciones superiores a los $1.000 \text{ mg N-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ y a los $370 \text{ mg P-PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$. Se puede observar en la Tabla 54 que existen discrepancias entre los valores simulados y experimentales para estos dos parámetros, especialmente en el caso del P-PO_4 . Esto se debe a las precipitaciones de compuestos inorgánicos (no volátiles) que se producen habitualmente en los digestores anaerobios. Las elevadas concentraciones de aniones y cationes (N-NH_4 , P-PO_4 , Mg, Ca, entre otros) provocan que se sobrepasen los productos de solubilidad de distintos sólidos y se formen los correspondientes precipitados (Liu et al., 2013). Estas precipitaciones son especialmente importantes en las EDAR con eliminación biológica de P (Barat et al., 2009; Martí et al., 2017), como es el caso de la EDAR de Calahorra. El modelo matemático utilizado no tiene en cuenta los procesos de precipitación incontrolada que tienen lugar por lo que predice una mayor concentración de la especie P-PO_4 . Así mismo, estas precipitaciones que tienen lugar en el digestor provocan un descenso del porcentaje de sólidos volátiles en el digestor, lo que también contribuye a la diferencia observada en este parámetro entre el valor simulado y experimental.

4.1.1.1. VALIDACIÓN DEL MODELO BNRM2

Una vez calibrado el modelo, se procedió a la **validación** del mismo, haciendo uso de los parámetros estequiométricos y cinéticos obtenidos en calibración y utilizando los datos de la segunda campaña de caracterización (diciembre 2019) (ver Tabla 55). Esto permitió comprobar la capacidad del modelo para reproducir el comportamiento de la planta en un momento distinto, consolidando su fiabilidad.

A partir de los valores presentados en la Tabla 55, y siguiendo el mismo procedimiento aplicado durante la fase de calibración, se llevó a cabo la caracterización del agua residual afluente según el modelo BNRM2, así como el cálculo de los correspondientes factores estequiométricos para la

validación del modelo. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 56 y Tabla 57, respectivamente.

Tabla 55. Características del agua residual afluyente (diciembre 2019).

Parámetro	Unidades	Valor
Caudal	$\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$	14.373
SST	$\text{mg SST} \cdot \text{L}^{-1}$	320
SSV	$\text{mg SSV} \cdot \text{L}^{-1}$	272
%SSV	%	85
DQO _T	$\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$	668
DQO _S	$\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$	200
DBO ₅	$\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$	421
DBO _{5,S}	$\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$	146
DBO _T	$\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$	537
DBO _S	$\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$	186
AGV	$\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$	25
ALK	$\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$	290
N _T	$\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$	40,1
N _{T,S}	$\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$	31,3
N-NH ₄	$\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$	31,2
P _T	$\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$	4,2
P _{T,S}	$\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$	2,5
P-PO ₄	$\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$	2,4
Temperatura	°C	15,6
pH	-	7,5

Si se compara con la caracterización empleada para la calibración (octubre 2018), las diferencias más importantes en los parámetros medidos son los siguientes: los valores de DQO_{T,sol} y DBO_{T,sol}, en la caracterización de 2019, son algo menores a los obtenidos en 2018 pero la relación DBO_T/DQO_T para ambas caracterizaciones (0,78 y 0,80, para octubre 2018 y diciembre 2019, respectivamente) es similar, por lo que la ratio de materia biodegradable afluyente se ha mantenido en el tiempo; no obstante, a pesar de que se mantiene la relación mencionada, el contenido soluble de la materia orgánica inerte (S_i) aumenta de un valor de 8 mg·L⁻¹ en la caracterización de 2018 a un valor de 14 mg·L⁻¹ en la de 2019, mientras que el contenido suspendido (X_i) de la misma se mantiene en el mismo orden en ambas caracterizaciones, siendo algo menor en 2019.

Tabla 56. Características del agua residual afluyente en función del modelo BNRM2 (diciembre 2019).

Parámetro	Valor	Unidades
S_F	161	mg DQO·L ⁻¹
S_A	25	mg DQO·L ⁻¹
S_{PRO}	0	mg DQO·L ⁻¹
S_I	14	mg DQO·L ⁻¹
S_{NH4}	31,2	mg N·L ⁻¹
S_{NO3}	0,03	mg N·L ⁻¹
S_{NO2}	0,04	mg N·L ⁻¹
S_{PO4}	2,4	mg P·L ⁻¹
S_{ALK}	294	mg CaCO ₃ ·L ⁻¹
X_I	117	mg DQO·L ⁻¹
X_S	351	mg DQO·L ⁻¹
X_{NV}	48	mg SST·L ⁻¹
X_H	0	mg DQO·L ⁻¹
X_{AUT}	0	mg DQO·L ⁻¹
X_{PAO}	0	mg DQO·L ⁻¹
X_{PP}	0	mg DQO·L ⁻¹
X_{PHA}	0	mg DQO·L ⁻¹
X_{ACID}	0	mg DQO·L ⁻¹
X_{MAC}	0	mg DQO·L ⁻¹
X_{MH2}	0	mg DQO·L ⁻¹
X_{TSS}	320	mg SST·L ⁻¹

Tabla 57. Valores de los factores estequiométricos para el agua afluyente (diciembre 2019).

Parámetro	Unidad	Valor
Nitrógeno:		
i_{NSI}	g N·g ⁻¹ DQO	0,00001
i_{NSF}	g N·g ⁻¹ DQO	0,00024
i_{NXI}	g N·g ⁻¹ DQO	0,03000
i_{NXS}	g N·g ⁻¹ DQO	0,01508
i_{NBM}	g N·g ⁻¹ DQO	0,07000
Fósforo:		
i_{PSI}	g P·g ⁻¹ DQO	0,00800
i_{PSF}	g P·g ⁻¹ DQO	0,00005
i_{PXI}	g P·g ⁻¹ DQO	0,00200
i_{PXS}	g P·g ⁻¹ DQO	0,00415
i_{PBM}	g P·g ⁻¹ DQO	0,02000
Sólidos suspendidos totales		
i_{SSTXI}	g SST·g ⁻¹ DQO	0,70000
i_{SSTXS}	g SST·g ⁻¹ DQO	0,54220
i_{SSTBM}	g SST·g ⁻¹ DQO	0,70000

A partir de la caracterización del agua de entrada mostrada en la Tabla 56 y Tabla 57 y empleando los parámetros cinéticos y estequiométricos de la Tabla 47, Tabla 48, Tabla 50, Tabla 51 y Tabla 52 se simuló de nuevo el funcionamiento de la EDAR. Para la validación del modelo con los datos experimentales de 2019, se mantuvo el mismo conjunto de parámetros calibrados, con la excepción de:

- q_{PHA} : Velocidad de acumulación de PHA de las bacterias PAO en el reactor biológico, al que se le asigna un valor de $5,0 \text{ g DQO} \cdot \text{gPAO}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ con el fin de aumentar así la velocidad de toma de S_A para las bacterias PAO y mejorar así la eliminación biológica de P en el efluente del proceso simulado.
- μ_{PRO} : Velocidad de crecimiento de las bacterias acetogénicas en el digestor, al que se le asigna un valor de $0,55 \cdot \text{d}^{-1}$. Este parámetro fue asignado con el objetivo de ajustar de la mejor manera posible el proceso de digestión a los valores experimentales de 2019.

Adicionalmente, se incorporaron los parámetros de sedimentación para los decantadores secundarios, seleccionados según valores representativos en EDAR urbanas (Barat et al., 2013), detallados en la Tabla 58.

Tabla 58. Valores de los parámetros de sedimentación utilizados de los decantadores secundarios utilizados en la validación del modelo.

Parámetro	Valor Utilizado
IVF ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)	200
V_0 ($\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	138
V_{Smax} ($\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	150
r_h ($\text{m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,000735
r_p ($\text{m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,0050
f_{ns}	0,00010

Con la modificación de estos parámetros a los valores que se indican, el modelo validado fue capaz de reproducir con precisión el comportamiento observado en la planta. A modo de ejemplo, en la Tabla 59 y Tabla 60, se comparan los valores simulados con los valores experimentales

correspondientes para el efluente de la EDAR y la salida del digestor anaerobio. Esta misma comparativa puede verse para el resto de unidades de la EDAR en el Anejo 7.2.

Efluente de EDAR

En la Tabla 59 se comparan los valores simulados para la corriente efluente de la EDAR (salida de decantación secundaria) con los valores experimentales para esta corriente obtenidos en caracterización de diciembre de 2019, observándose que el modelo calibrado es capaz de reproducir los rendimientos de eliminación de materia orgánica y sólidos suspendidos (valores del 97%). Por lo que respecta a la eliminación de nutrientes, los datos experimentales indican que en el caso del N-NH₄ se consigue un rendimiento de eliminación del 96%, mientras que en el caso de la eliminación de P-PO₄ se alcanza un porcentaje del 87%. El rendimiento de eliminación de N-NH₄ se reproduce adecuadamente en el modelo validado, mientras que en el caso de la eliminación de P-PO₄ se alcanza un porcentaje de eliminación algo menor. No obstante, las concentraciones simuladas y experimentales de N-NH₄ y de P-PO₄ son similares.

Tabla 59. Resultados de la calibración del modelo con respecto al efluente de la EDAR junto con los valores experimentales de diciembre de 2019.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Efluente		
SST (mg·L ⁻¹)	8	10
SSV (%)	81	63
Eliminación SST (%)	97	97
DQO _T (mg DQO·L ⁻¹)	24	38
Eliminación DQO _T (%)	96	94
DQO ₅ (mg DQO·L ⁻¹)	15	23
DBO ₅ (mg DBO·L ⁻¹)	4	12
DBO _{5,5} (mg DBO·L ⁻¹)	1	9
N-NH ₄ (mg N·L ⁻¹)	0,02	1,2
Eliminación N-NH ₄ (%)	99	96
N _T (mg N·L ⁻¹)	5,6	5,4
P-PO ₄ (mg P·L ⁻¹)	0,6	0,3
Eliminación P-PO ₄ (%)	75	87
P _T (mg P·L ⁻¹)	0,9	0,5
pH	7,4	7,7
Alcalinidad (mg CaCO ₃ ·L ⁻¹)	184,6	n.d.

Digestión anaerobia

La Tabla 60 muestra los valores simulados y los valores experimentales referentes al fango digerido y al biogás generado.

Tabla 60. Resultados de la validación del modelo con respecto a la digestión anaerobia junto con los valores experimentales de diciembre de 2019.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango digerido		
SST ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	26.415	21.411
Eliminación SST (%)	36	40
SSV (%)	71	68
Eliminación SSV (%)	44	49
DQO ($\text{mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$)	30.137	22.950
DQO ₅ ($\text{mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.991	390
AGV ($\text{mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$)	30,1	128
N-NH ₄ ($\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$)	818	1.095
P-PO ₄ ($\text{mg P}\cdot\text{L}^{-1}$)	292	71,1
P _T ($\text{mg P}\cdot\text{L}^{-1}$)	503	691
pH	6,3	7,6
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	1.365	3.613
Biogás		
Caudal ($\text{Nm}^3\cdot\text{d}^{-1}$)	1.905	1.408
% CH ₄	59,4	62
% H ₂	0,01	n.d.
% CO ₂	40,5	n.d.
% H ₂ S	0,03	n.d.

Con respecto al resultado experimental de la eliminación de sólidos suspendidos volátiles en el fango digerido (49% Eliminación SSV), se observa que en la validación del modelo se alcanza un porcentaje de eliminación algo menor (44%), aunque bastante parecido al experimental. Se observa una adecuada reproducción del caudal de biogás generado en el proceso de digestión, asociada con la transformación completa de la materia orgánica soluble biodegradable (S_F) que entra al digestor.

Así mismo, en este proceso anaerobio la muerte de las bacterias unido a la hidrólisis de la materia orgánica suspendida provoca la liberación de una gran cantidad de N-NH₄, alcanzándose una

concentración superior a los 1.000 mg N-NH₄·L⁻¹, tal y como se puede observar en los datos experimentales.

Por otra parte, el valor experimental de la concentración de P-PO₄ en el fango digerido es de 71,1 mg·L⁻¹ lo cual discrepa con el valor simulado. Igual que en la de fase de calibración, una posible explicación a esta discrepancia se encuentra en las precipitaciones de compuestos inorgánicos (no volátiles) que se producen habitualmente en los digestores anaerobios. El modelo matemático utilizado no tiene en cuenta estos procesos de precipitación incontrolada que tienen lugar por lo que predice una mayor concentración de la especie P-PO₄, lo que a su vez produce una predicción de un mayor porcentaje de sólidos volátiles (71% de SSV), en comparación al valor experimental (68%).

4.2.2. SIMULACIÓN DE LOS ESCENARIOS ALTERNATIVOS PARA LA RECUPERACIÓN DE P

Con el modelo BNRM2 calibrado y validado, se procedió a evaluar distintos escenarios alternativos a la línea de fangos actual de la EDAR de Calahorra, con el objetivo de maximizar la recuperación de P antes de la digestión anaerobia. Esta estrategia busca minimizar la precipitación incontrolada de P en el digestor, un fenómeno identificado durante las fases de calibración y validación del modelo, y que puede mitigarse reduciendo la carga de P que alcanza dicha etapa.

Estudios previos (Bouzas et al., 2019; N. Martí et al., 2017) han demostrado que la combinación de una cámara de mezcla con la elutriación del fango mixto en un espesador primario constituye una solución eficaz para extraer concentraciones elevadas de P antes de la digestión anaerobia. Estos antecedentes sentaron las bases para la propuesta de escenarios sin intervención enzimática.

Paralelamente, los ensayos enzimáticos realizados a escala laboratorio (ver apartado 4.1) permitieron evaluar la eficacia de enzimas fitasas y celulolíticas en la liberación de P a partir de la fracción orgánica del fango. Los resultados obtenidos sirvieron como referencia para explorar, a escala de simulación, el impacto potencial de aplicar estos tratamientos en condiciones representativas de la EDAR de Calahorra.

Sobre esta base, se diseñaron y simularon diferentes escenarios orientados a favorecer la liberación de P en forma soluble ($P-PO_4$), facilitando su posterior valorización mediante cristalización (en forma de estruvita u otras sales de interés). Las estrategias simuladas combinan dos enfoques complementarios:

- La **elutriación del fango**, para extraer el P intracelular acumulado por bacterias PAO.
- **Elutriación combinada con hidrólisis enzimática**, para transformar el P orgánico en $P-PO_4$, aumentando así la fracción recuperable.

Con el fin de evaluar la eficacia de ambas estrategias, las simulaciones se agruparon en dos bloques principales:

Simulaciones sin hidrólisis enzimática

Se evaluaron dos escenarios alternativos sin aplicar tratamientos enzimáticos, con el objetivo de identificar condiciones operativas que maximizasen la extracción de P mediante elutriación:

- **Escenario 0:** Elutriación del fango mixto procedente de la cámara de mezcla mediante recirculación al espesador primario por gravedad. Esta configuración, ya implementada, aunque no operativa en la EDAR de Calahorra, se basa en estrategias contrastadas en estudios previos (Bouzas et al., 2019; Martí et al., 2017).
- **Escenario 1:** Elutriación del fango de la cámara de mezcla en una centrífuga, que mejora el control operativo y evita los problemas de desbordamiento observados en el espesador primario.

Simulaciones con hidrólisis enzimática

Se simularon los mismos escenarios anteriores incorporando el efecto de la hidrólisis enzimática, reproduciendo en el modelo la liberación de $P-PO_4$ observada en los ensayos de laboratorio. El objetivo fue evaluar el impacto de esta intervención sobre la eficiencia global de recuperación de P:

- **Escenario 2:** Variante del Escenario 0, con adición de enzimas hidrolíticas en la cámara de mezcla. Esta intervención promueve una mayor liberación de P antes del espesado.
-

- **Escenario 3:** Variante del Escenario 1, que incorpora también el tratamiento enzimático para potenciar la recuperación de $P-PO_4$ en el sobrenadante de la centrífuga.

Todas las simulaciones se realizaron utilizando la caracterización del agua afluyente correspondiente a diciembre de 2019 y los parámetros cinéticos y estequiométricos definidos en la validación del modelo BNRM2.

En todos los escenarios se simuló una cámara de mezcla previa a la digestión anaerobia, donde el fango secundario (rico en bacterias PAO) se mezcla con una fracción del fango primario espesado. En esta cámara, las bacterias PAO absorben AGV generados por bacterias acidogénicas y liberan el P intracelular almacenado en forma de Poly-P. La corriente efluente de esta cámara se somete a un proceso de elutriación para separar el $P-PO_4$ en un sobrenadante con baja concentración de sólidos, adecuado para su recuperación mediante cristalización.

En los siguientes apartados se detallan los esquemas de cada escenario y los resultados obtenidos en las simulaciones, analizando su eficacia para aumentar la recuperación de P en la EDAR de Calahorra.

4.2.2.1. ESCENARIOS SIN HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

4.2.2.1.1. ESCENARIO 0

El sistema de elutriación propuesto bajo la denominación de “Escenario 0, consiste en recircular el fango de la cámara de mezcla (fango mezcla) al espesador de gravedad (espesador primario) de la EDAR. En este espesador, los componentes solubles presentes en el fango mezcla (incluido el $P-PO_4$) son lavados y extraídos con el sobrenadante del espesador. El fango espesado se distribuye una parte a digestión y otra a la cámara de mezcla. Por su parte, **el sobrenadante del espesador primario, enriquecido en P, se utilizaría como corriente de entrada a un proceso de cristalización, junto con el sobrenadante generado en la etapa de deshidratación de fangos.** Esta configuración se encontraba ya implementada en la EDAR de Calahorra, pero no operativa. Las simulaciones presentadas a continuación han permitido establecer cuál sería el potencial de extracción de P bajo esta configuración.

- **Caudal a digestión (Q_{dig}):** este parámetro se ve limitado por la concentración de sólidos de la corriente de fango espesado que va al digestor anaerobio. El límite se encuentra relacionado con la concentración máxima de sólidos a la que los agitadores mecánicos de los digestores anaerobios son capaces de trabajar. La concentración de SST en esta corriente no debe superar los $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (teniendo en cuenta que la reducción promedio de SST en la digestión de Calahorra está alrededor del 45%). En estudios previos (Bouzas et al., 2019; N. Martí et al., 2017), llevados a cabo con un solo digestor anaerobio en marcha, se estableció un intervalo de actuación de 45 a $105 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$.

En base a estas premisas, en la presente tesis doctoral se decidió trabajar entre los siguientes intervalos:

- **Caudal de elutriación de la cámara de mezcla al espesador primario (Q_{elut}):** de 25 a $65 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$.
- **Caudal a digestión (Q_{dig}):** de 96 a $150 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$, considerando la operación de los dos digestores anaerobios de la EDAR de Calahorra.

Para cada simulación se fijaron los parámetros operacionales más importantes del sistema (Q_{elut} y Q_{dig}), dentro de los intervalos previamente definidos. Una vez fijados los parámetros operacionales a evaluar, se analizaron los resultados obtenidos. En la Tabla 61 se presentan los resultados de las principales simulaciones realizadas sobre la configuración del Escenario 0, haciéndose referencia a las siguientes variables:

- a. Cantidad de Poly-P a la salida de la cámara de mezcla ($X_{\text{PP Salida CM}}$)
 - b. Caudal del sobrenadante del espesador primario ($Q_{\text{Sob. Esp. 1}^\circ}$)
 - c. Concentración de P-PO_4 presente en el sobrenadante del espesador primario ($\text{P-PO}_4 \text{ Sob. Esp. 1}^\circ$)
 - d. Cantidad de P-PO_4 recuperado en el sobrenadante del espesador primario ($\text{P-PO}_4 \text{ recup Sob. Esp. 1}^\circ$)
-

- e. Espesor del manto de fangos del espesador primario (h)
- f. Concentración de sólidos suspendidos en el sobrenadante del espesador primario ($SST_{Sob. Esp. 1^{\circ}}$)
- g. Concentración de sólidos suspendidos en el fango espesado que va a digestión ($SST_{Dig. An}$)
- h. Caudal de biogás generado en el proceso de digestión anaerobia ($Q_{biogás}$)
- i. Caudal del sobrenadante del deshidratador de fango digerido ($Q_{Sob. Desh}$)
- j. Concentración de P- PO_4 presente en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido ($P-PO_4_{Sob. Desh.}$)
- k. Cantidad de P- PO_4 recuperado en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido ($P-PO_4_{recup Sob. Desh}$)

Las simulaciones recogidas en la Tabla 61 se realizaron manteniendo fijo el valor del parámetro IVF en $27 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, correspondiente a la unidad de espesador primaria de la configuración original (Validación del modelo, ver Tabla A 14 de Anejos). Se evaluaron distintos porcentajes de reparto entre los caudales a digestión y a elutriación ($\%Q_{dig}$ y $\%Q_{elut}$): 85 y 15%, 70 y 30%, 55 y 45%, 40 y 60% y 10 y 90%. Así mismo, se varió la ratio Q_{ext}/Q_e , que determina el porcentaje del caudal de entrada al espesador primario extraído por el fondo del mismo. Estos porcentajes de reparto, junto con la relación Q_{ext}/Q_e , son los que definen los caudales enviados a digestión (Q_{dig}) y a elutriación (Q_{elut}).

Tabla 61. Valores de los parámetros fijados en espesador primario, porcentajes de repartición a digestión y a cámara mezcla del Escenario 0 y principales resultados obtenidos.

Escenario 0	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Parámetros operacionales fijados						
IVF Esp. 1°	27	27	27	27	27	27
%Q_{dig}	85	85	70	55	40	10
%Q_{elut}	15	15	30	45	60	90
Q_{ext}/Q_e	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6
Q_{dig} (m³·d⁻¹)	96	117	107	94	101	27
Q_{elut} (m³·d⁻¹)	43	47	72	104	117	271
Parámetros observados						
X_{PP} Salida CM (mg·L⁻¹)	2,9	21,8	2,4	2,4	2,5	2,5
Q_{Sob. Esp. 1°} (m³·d⁻¹)	113	92	102	114	108	182
P-PO₄ Sob. Esp. 1° (mg·L⁻¹)	140	132	135	136	144	154
P-PO₄ recup Sob. Esp. 1° (kg·d⁻¹)	15,8	12,1	13,8	15,6	15,6	28,0
h (m)	3,0	1,4	1,4	2,0	3,0	3,0
SST_{Sob. Esp. 1°} (mg·L⁻¹)	794	785	845	938	997	13.431
SST_{Dig. An} (mg·L⁻¹)	35.651	30.819	32.951	36.882	33.549	34.943
Q_{biogás} (m³·d⁻¹)	1.703	1.785	1.739	1.687	1.632	452
Q_{Sob.Desh} (m³·d⁻¹)	82	103	93	80	87	23
P-PO₄ Sob.Desh (mg·L⁻¹)	48	48	47	46	46	34
P- PO₄ recup.Sob.Desh (kg·d⁻¹)	3,9	5,0	4,3	3,7	4,0	0,8

Como se puede observar en la Tabla 61, en las simulaciones S1 y S2 se utilizaron los mismos porcentajes de repartición (85% a digestión y 15% a elutriación), variando la ratio Q_{ext}/Q_e de 0,5 (S1) a 0,6 (S2). Esto condujo a un Q_{dig} de $96 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ y un Q_{elut} de $43 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ para S1, mientras en S2 se obtuvieron unos caudales de 117 y $47 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente.

En S2 aumenta significativamente la concentración de X_{pp} a la salida de la cámara de mezcla ($21,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) con respecto a la que se tiene en S1 ($2,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), o lo que es lo mismo, mayor cantidad de P inorgánico queda por extraerse en el sistema de elutriación.

Con respecto a S1, el reparto de caudales provoca una menor concentración de sólidos en la corriente a digestión de $35.651 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respecto al valor simulado que se tenía en dicha corriente en la configuración sin elutriación ($42.861 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ver Tabla A 19), así como una acumulación de sólidos en el interior del espesador primario, que elevan la altura del mango de fangos hasta 3 m (ver Figura 87), aunque no se observa un incremento importante de SST en la corriente sobrenadante del espesador primario.

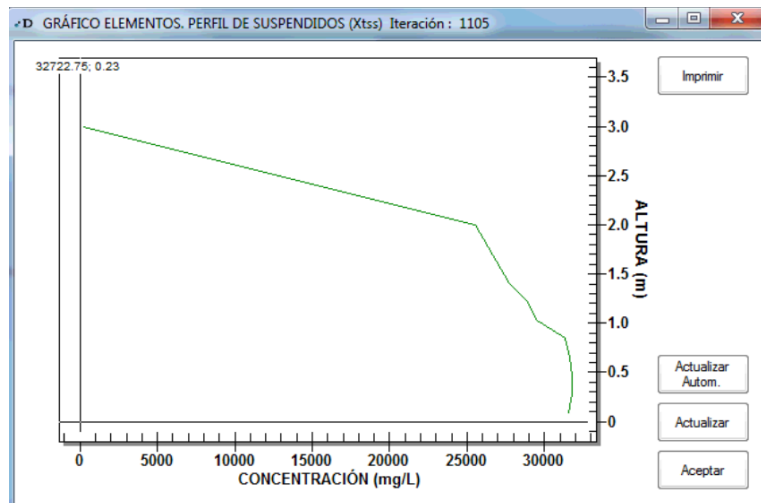


Figura 87. Perfil SST Esp. 1º - Espesor manto Esp. 1º de 3,0 m para la simulación S1.

En el caso de S2, el reparto de los porcentajes permite reducir la concentración de sólidos en la corriente a digestión ($30.819 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) con respecto a la alcanzada en la simulación sin elutriación, y a la vez obtener una altura del manto de fangos alrededor de 1,4 m con un perfil de SST más estable (ver Figura 88).

Tanto en S1 como en S2 el caudal de biogás generado en el proceso de digestión anaerobia se mantiene alrededor de $1.700 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. Finalmente, la cantidad total de P-PO_4 recuperado en las corrientes sobrenadante del espesador primario y del deshidratador de fango digerido es mayor en S1 ($19,7 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$) que en S2 ($17,1 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$). Por tanto, un aumento de la ratio Q_{ext}/Q_e en el espesador primario conduce a una menor recuperación del P-PO_4 en el sistema de elutriación, pero en cambio mantiene una altura del mango de fangos más controlada.

En la simulación S3 se variaron los porcentajes de repartición de caudal, fijándolos en un 70% a digestión y un 30% a elutriación. Así mismo, se fijó la ratio Q_{ext}/Q_e en 0,6 obteniéndose un Q_{dig} de 107 y un Q_{elut} de $72 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. Esta prueba se realizó en base a los resultados obtenidos en las simulaciones S1 y S2, en las que no se producen desbordamientos del espesador primario. Con esta prueba se pretendía observar sí, aun con un Q_{elut} por encima del valor límite establecido en base a la experiencia en proyectos anteriores, puede mantenerse bajo control el manto de fangos.

Tal y como se puede observar en la Tabla 61, para S3 la concentración de X_{pp} a la salida de la CM es bastante baja ($2,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), de lo que se induce que el sistema de elutriación consigue un elevado rendimiento de extracción del P inorgánico. Con respecto a los SST a digestión, este reparto de caudales genera una menor concentración del fango primario espesado, con un valor de $32.951 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, inferior al observado en la configuración sin elutriación. A la vez se obtiene una altura del manto de fangos alrededor de 1,4 m con un perfil de SST estable (ver Figura 88). Por último, la cantidad total de P-PO_4 recuperado en las corrientes sobrenadante del espesador primario y del deshidratador de fango digerido es de $18,1 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$, es decir, una cantidad intermedia con respecto a las obtenidas en las simulaciones S1 y S2. Así mismo, el caudal de biogás generado se mantiene alrededor de los $1.700 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. Se hizo una prueba para este mismo reparto de caudales con una ratio Q_{ext}/Q_e de 0,5. En esta se observó una acumulación de sólidos incontrolable en el espesador primario, lo cual conducía al desbordamiento de esta unidad. Por tanto, esta prueba se considera fallida y no se ha incluido en los resultados presentados.

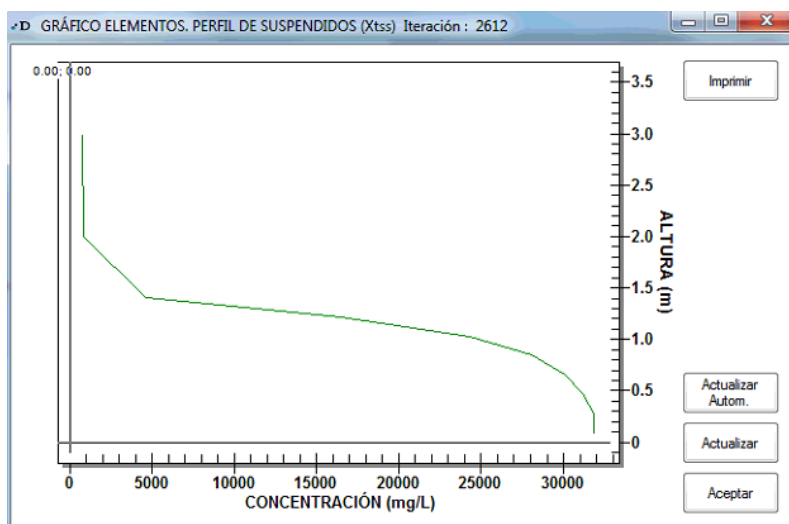


Figura 88. Perfil SST Esp. 1º - Espesor manto Esp. 1º de 1,4 m para la simulación S2 y S3.

En la simulación S4 se variaron los porcentajes de repartición de caudal, fijándolos en un 55% a digestión y un 45% a elutriación. Así mismo, se fijó la ratio Q_{ext}/Q_e en 0,6 obteniéndose un Q_{dig} de $94 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ y un Q_{elut} de $104 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. Al igual que en S3, el valor del Q_{elut} se encuentra por encima del valor máximo establecido. La prueba se realizó con el fin de observar hasta qué punto se puede forzar el sistema sin provocar el desbordamiento de la unidad de espesamiento primario. Para esta simulación la concentración de X_{pp} presente a la salida de la CM es igual a la obtenida en S3 ($2,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Además, la concentración de sólidos en la corriente de fango espesado primario ($36.882 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) resultó inferior a la obtenida en la configuración sin elutriación, aunque superior a la registrada en las simulaciones anteriores (ver Tabla 61). Esto provoca que haya una menor carga orgánica a la entrada del digestor anaerobio. Por ello, se obtiene un caudal de biogás ligeramente menor al alcanzado en las simulaciones anteriores ($1.687 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$).

La altura del mango de fangos alcanzada en el espesador primario es de 2 m, con un perfil de SST un poco más inestable que en las simulaciones S2 y S3 (ver Figura 89). Cabe resaltar que con estas variables operacionales se obtiene un buen resultado de recuperación total de P- PO_4 en las corrientes sobrenadante del espesador primario y del deshidratador de fango digerido ($19,3 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$), bastante parecido a la cantidad recuperada en S1, pero con una altura del manto de fangos más controlada. Con este reparto de caudales también se hizo una prueba con una ratio Q_{ext}/Q_e de 0,5 que resultó fallida al observarse el desbordamiento del espesador primario.

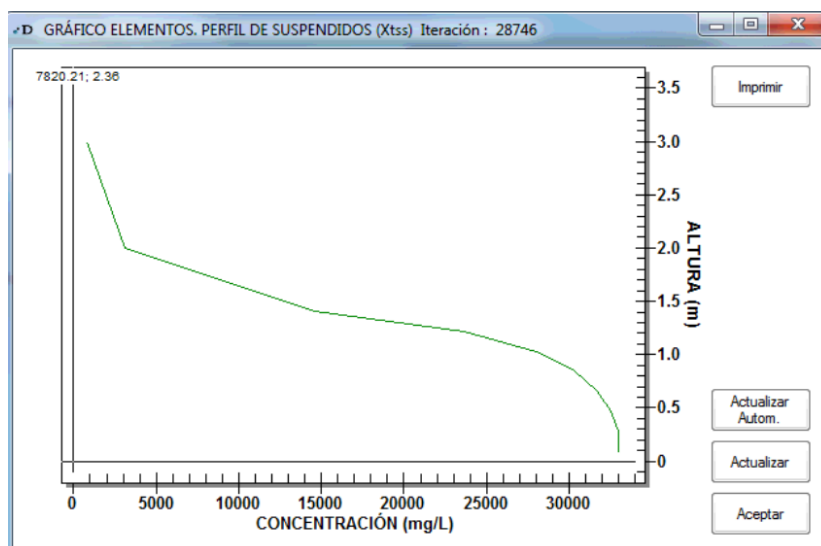


Figura 89. Espesor manto Esp. 1° de 2,0 m para la simulación S4.

En la simulación S5 se variaron los porcentajes de repartición de caudal, fijándolos en un 40% a digestión y un 60% a elutriación. Así mismo, se fijó la ratio Q_{ext}/Q_e en 0,7, ya que con un valor de 0,6 la cantidad de SST que se escapan por el sobrenadante del espesador primario es muy elevada. Con estos parámetros fijados se obtuvieron unos caudales de $101 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ a digestión y de $117 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ a elutriación. Al igual que en S3 y S4, en esta prueba el reparto de caudales provocó que se trabaje con un caudal a elutriación bastante elevado, que supera el límite superior del intervalo de actuación fijado. Como en los casos anteriores, esta prueba se realizó con el objetivo de observar si, con este reparto de caudales se mantiene controlada la altura del manto de fangos. Sin embargo, a diferencia de S3 y S4, en esta prueba el espesador primario presenta un perfil de SST inestable, cuya altura alcanza un valor de 3,0 m (a pesar de haber intentado controlar este hecho aumentando la ratio Q_{ext}/Q_e). Así mismo, no se consigue recuperar una cantidad total de P-PO_4 mayor a la obtenida en simulaciones anteriores (ver Tabla 61).

Finalmente, con el único fin de conocer la máxima cantidad total de P-PO_4 que se podría recuperar del sistema de elutriación, se realizó la simulación S6. En esta se variaron los porcentajes de repartición de caudal, fijándolos en un 10% a digestión y un 90% a elutriación. Se fijó la ratio Q_{ext}/Q_e en 0,6, obteniéndose un Q_{dig} de $27 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ y un Q_{elut} de $271 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. Como cabía esperar, se observó un desbordamiento del espesador primario, alcanzándose una altura del manto de fangos de 3 m y una concentración de SST en el sobrenadante del espesador primario muy elevada ($13.431 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Por lo

tanto, esta configuración no sería factible, ya que el espesador primario presentaría problemas de desbordamiento.

En base a los resultados obtenidos para el Escenario 0, se propone la alternativa S4 como la operación de este escenario, presentándose las condiciones operacionales del sistema en la Tabla 62. En S4, a pesar de que el parámetro Q_{elut} supera el máximo inicialmente fijado, no se observan desbordamientos del espesador primario, lográndose aumentar la cantidad global de P recuperado ($19,3 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$, ver Tabla A 23). Esto es debido a que, al trabajar con dos digestores y poder llevar más caudal a digestión, se tiene un mayor margen con el Q_{elut} con respecto al establecido inicialmente. Así, en S4 se consigue la mayor cantidad de P recuperado con respecto a las simulaciones viables (sin desbordamiento del espesador primario). En contraste, el Escenario S1 fue descartado debido a que presenta un perfil de manto de fangos más inestable respecto a S2, S3 y S4, comprometiendo la eficiencia operativa. Asimismo, los Escenarios S5 y S6 fueron eliminados del análisis final, ya que conducen a desbordamientos en el espesador primario, lo que representa una condición inaceptable desde el punto de vista operativo.

Tabla 62. Condiciones operacionales óptimas del Escenario 0

Parámetros	Valores
% Q_{Dig}	55
% Q_{elut}	45
$Q_{dig} \text{ (m}^3\cdot\text{d}^{-1}\text{)}$	94
$Q_{elut} \text{ (m}^3\cdot\text{d}^{-1}\text{)}$	104

Si bien el objetivo principal de las simulaciones realizadas es maximizar la recuperación de P, también debe prestarse atención a otra serie de elementos que son extraídos en el proceso de elutriación y que tienen importancia de cara a un posterior proceso de cristalización. Por ello, en el apartado 7.3.1 de Anejos (desde Tabla A 21 hasta Tabla A 24) se presentan los caudales máxicos de P- PO_4 , N- NH_4 , Mg soluble (Mg sol), Ca soluble (Ca sol) y K soluble (K sol) correspondientes al sobrenadante del espesador, al del deshidratador de fango digerido y a una hipotética corriente combinada de ambos. Además, se presentan las concentraciones de estos mismos componentes en la corriente conjunta,

así como las relaciones molares Ca/P, N/P y Mg/P en cada una de las tres corrientes analizadas (desde Tabla A 25 hasta Tabla A 27). Así, se puede observar que la simulación S6 mostró los mejores resultados en términos de recuperación total de P, alcanzando un valor de $28,8 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$, y presentó además la mayor concentración de P-PO₄ en la corriente conjunta (sobrenadante del espesador primario más el del deshidratador de fango digerido), con $140,46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Estas condiciones favorecerían claramente la valorización del P mediante procesos de cristalización, como la precipitación de estruvita. Sin embargo, S6 no es viable desde el punto de vista operativo, ya que conduce a desbordamientos en el espesador primario, como ya se ha comentado. Por tanto, la selección de escenarios óptimos debe limitarse a aquellos que, sin comprometer la operación de la planta, ofrezcan una recuperación de P significativa. En este sentido, los escenarios S2, S3 y S4 se consideran los más apropiados. Entre estos, los **mejores resultados** en cuanto a **caudal másico de P recuperado y concentración de P-PO₄** en la corriente conjunta, se obtienen para la **simulación S4**.

Desde la perspectiva de viabilidad de precipitación de estruvita, se evaluaron también las relaciones molares entre los principales iones involucrados (ver Tabla A 25 a Tabla A 27, apartado 7.3.1 de Anejos), teniendo en cuenta que la relación molar Mg:NH₄:PO₄ teórica requerida para la precipitación de estruvita es 1:1:1 (Uysal et al., 2010). En el caso de S4 (ver Tabla A 27), la relación Mg/P fue de 0,36, un valor que, aunque inferior al ideal estequiométrico de 1, puede alcanzarse mediante la adición de Mg en el proceso real (Uysal et al., 2010). En cuanto a la relación N/P, se obtuvo un valor excedentario (7,31), lo cual asegura la disponibilidad de N-NH₄. Así mismo, un exceso de N-NH₄ puede contribuir a formar cristales de estruvita de mayor pureza (Stratful et al., 2001). Por último, la relación Ca/P disminuyó progresivamente de S2 (0,84) a S4 (0,78). Este comportamiento es favorable, ya que un valor elevado de Ca/P podría favorecer la precipitación competitiva de fosfatos cálcicos (como hidroxiapatita) en lugar de estruvita (Barat, 2004; Musvoto, 2000), reduciendo así la recuperación efectiva de P en forma de estruvita. El valor más bajo de Ca/P en S4 resulta especialmente positivo, al disminuir este riesgo y aumentar la selectividad hacia la estruvita.

Por tanto, la **alternativa S4**, además de **permitir una recuperación eficaz de P** manteniendo la estabilidad del sistema, **proporciona unas relaciones molares adecuadas para** una posterior

cristalización de estruvita, especialmente en cuanto al ratio Ca/P que destaca por ser el menor valor con respecto a las otras simulaciones consideradas como viables (S2 y S3).

No obstante, ante la problemática que presenta el Escenario 0 para mantener bajo control la altura del manto de fangos del espesador primario, se procede a estudiar otro tipo de configuración. Con el fin de evitar problemas operacionales causados por el desbordamiento del espesador se plantea el Escenario 1 de extracción de P mediante elutriación del fango de la cámara de mezcla en centrífuga, cuyo análisis se detalla en el siguiente apartado.

4.2.2.1.2. ESCENARIO 1

Debido a los problemas de desbordamiento que presenta el Escenario 0, se planteó una nueva configuración de la línea de fangos de la EDAR de Calahorra. Con esta nueva configuración se pretende aprovechar la suelta de $P-PO_4$ que se produce en la cámara de mezcla debido a la degradación de Poly-P. Para recuperar el P presente en esta corriente, se planteó la elutriación del fango de la cámara de mezcla en una centrífuga (representado en DESASS como un elemento de deshidratación). En el sobrenadante de esta unidad se extraería el P recuperado de este sistema.

A diferencia del Escenario 0, en esta configuración no se realiza la elutriación en el espesador primario. En su lugar, se introduce un nudo previo a la digestión anaerobia (ND 2), desde el cual se divide el caudal de fango en dos corrientes: una se dirige directamente al digestor, mientras que la otra es conducida al sistema de deshidratación (simulación de la centrífuga). Esta unidad realiza una separación en dos fases del fango procedente de la cámara de mezcla: una corriente líquida enriquecida en P (sobrenadante), y otra sólida que se reincorpora a la línea de fangos mediante el nudo ND 1, donde se mezcla con los fangos primario y secundario previamente espesados. La Figura 90 muestra el diagrama de flujo correspondiente introducido en el programa DESASS.

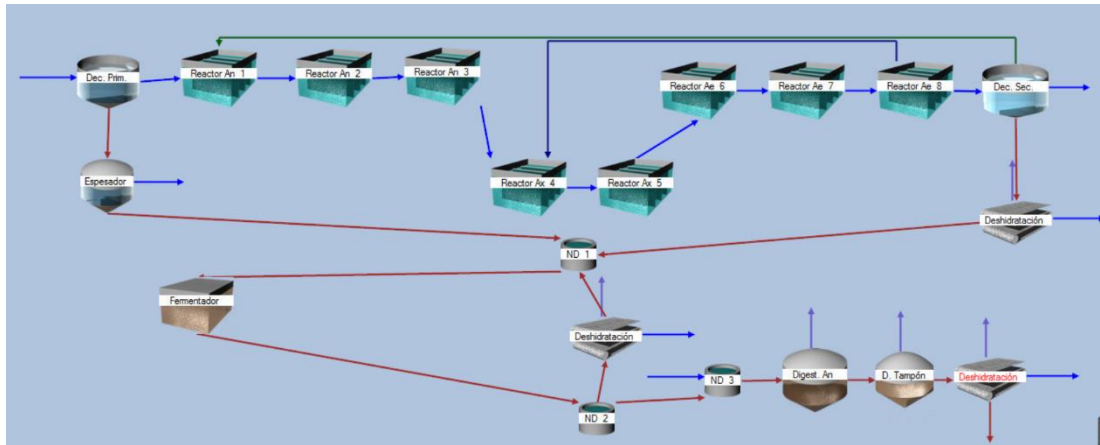


Figura 90. Diagrama de flujo del escenario 1 de la EDAR de Calahorra del programa DESASS.

Los parámetros operativos modificados en el proceso de optimización fueron los siguientes

- La **concentración de SST en el fango** a la salida de la centrífuga (**SST_{Fango Centr}**): se le asignó un intervalo entre un 6 a un 10%, en base a una serie de ensayos previos realizados en la EDAR de Calahorra.
- **Caudal a centrífuga y caudal a digestión (Q_{centr} y Q_{dig})**: para el reparto de estos caudales se fijó como objetivo maximizar tanto la concentración de P-PO₄ en la corriente sobrenadante de la centrífuga como el caudal de la misma.

Para cada simulación se fijan los parámetros operacionales más importantes del sistema ($SST_{\text{Fango Centr}}$, Q_{centr} y Q_{dig}). En la Tabla 63 se presentan los resultados de las principales simulaciones realizadas sobre la configuración del Escenario 1, haciéndose referencia a los siguientes parámetros variables:

- Caudal del sobrenadante de la centrífuga ($Q_{\text{Sob Centr}}$)
- Concentración de P-PO_4 presente en el sobrenadante de la centrífuga ($\text{P-PO}_4_{\text{Sob. Centr}}$)
- Cantidad de P-PO_4 recuperado en el sobrenadante de la centrífuga ($\text{P-PO}_4_{\text{recup. Sob. Centr}}$)

- d. Caudal del sobrenadante del deshidratador de fango digerido ($Q_{\text{Sob. Desh}}$)
- e. Concentración de P-PO_4 presente en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido ($\text{P-PO}_4 \text{ Sob. Desh}$)
- f. Cantidad de P-PO_4 recuperado en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido ($\text{P-PO}_4 \text{ recup. Sob. Desh}$)
- g. Cantidad de Poly-P a la salida de la cámara de mezcla ($x_{\text{PP Salida CM}}$)
- h. Caudal de biogás generado en el proceso de digestión anaerobia ($Q_{\text{biogás}}$)
- i. Concentración de sólidos suspendidos en el fango espesado que va a digestión ($\text{SST}_{\text{Dig. An}}$)

Las simulaciones que se presentan en la Tabla 63 se realizaron utilizando los siguientes porcentajes de repartición de los caudales a digestión y centrífuga ($\%Q_{\text{dig}}$ y $\%Q_{\text{centr}}$): 85 y 15% y 70 y 30%. Así mismo, se varió la concentración de sólidos en el fango (parámetro operacional que se asigna a la centrífuga) dentro del intervalo previamente establecido, de un 6 a un 10%. Así, son los porcentajes de repartición y los $\text{SST}_{\text{Fango Centr}}$ los que definen los caudales que van a digestión (Q_{dig}) y a la centrífuga (Q_{centr}).

Tabla 63. Valores de los parámetros fijados en espesador primario, porcentajes de repartición a digestión y centrifuga del Escenario 1 y principales resultados obtenidos.

Escenario 1	S1	S2	S3	S4
Parámetros operacionales fijados				
SST_{Fango Centr} (%)	6	8	9	6
%Q ND2-Dig	85	85	85	70
%Q ND2-Centrífuga	15	15	15	30
Q_{dig} (m³·d⁻¹)	81	79	78	77
Q_{centr} (m³·d⁻¹)	14	14	14	33
Parámetros observados				
X_{PP Salida CM} (mg·L⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5
Q_{Sob. Centr} (m³·d⁻¹)	4	6	7	8
P-PO_{4 Sob. Centr} (mg·L⁻¹)	88,2	88,5	88,6	88,7
P-PO_{4 recup. Sob. Centr} (kg·d⁻¹)	0,35	0,54	0,61	0,70
SST_{Dig. An} (mg·L⁻¹)	43.443	44.604	45.005	45.583
Q_{biogás} (m³·d⁻¹)	1.782	1.770	1.765	1.759
Q_{Sob. Desh.} (m³·d⁻¹)	67	64	64	63
P-PO_{4 Sob. Desh} (mg·L⁻¹)	86	85	85	84
P- PO_{4 Sob.Desh} (kg·d⁻¹)	5,7	5,5	5,4	5,3

Como se puede observar en la Tabla 63, en las simulaciones S1, S2 y S3 se utilizaron los mismos porcentajes de repartición (85% a digestión y 15% a centrífuga), variando $SST_{\text{Fango Centr}}$, de un 6% a un 9%. Para estas tres simulaciones, se obtuvieron caudales a digestión y a centrífuga muy similares (Q_{dig} de $81 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ para S1, de $79 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ para S2 y de $78 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ para S3; el caudal a centrífuga se sitúa a $14 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ en las tres simulaciones). No obstante, se observó que la variación del parámetro operacional $SST_{\text{Fango Centr}}$ tiene efecto sobre el caudal sobrenadante de la centrífuga ($Q_{\text{Sob. Centr.}}$). En concreto, en el caso de S1, se asignó un valor de $SST_{\text{Fango Centr}}$ del 6%, obteniéndose un $Q_{\text{Sob. Centr.}}$ de $4 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, mientras que en S2 $SST_{\text{Fango Centr}}$ se fijó en 8%, lo cual elevó el $Q_{\text{Sob. Centr.}}$ hasta un valor de $6 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. Por su parte, en S3 un valor de $SST_{\text{Fango Centr}}$ del 9% provoca que el $Q_{\text{Sob. Centr.}}$ alcance un valor de $7 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$.

De ello se puede deducir que cuanto más elevado sea el valor que se asigne al parámetro $SST_{\text{Fango Centr}}$, mayor será el caudal del sobrenadante de la centrífuga. Esto resulta importante, ya que la recuperación de P en esta corriente depende completamente de maximizar el $Q_{\text{Sob. Centr.}}$, pues la concentración de $\text{P-PO}_4_{\text{ Sob Centr}}$ se mantiene prácticamente constante en todas las simulaciones, aumentando ligeramente de $88,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (S1) a $88,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (S3).

En consecuencia, en la simulación S1 se obtuvo una cantidad de $\text{P-PO}_4_{\text{ recup. Sob Centr}}$ de $0,35 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$, ya que se opera con el menor $SST_{\text{Fango Centr}}$, mientras en S2 se obtiene una cantidad ligeramente mayor ($0,54 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$) y en S3 se obtiene el máximo valor con respecto a S1 y S2 ($0,61 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$). No obstante, esta cantidad de P recuperada es poco significativa con respecto a la obtenida en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido ($\text{P-PO}_4_{\text{ Sob.Desh}}$), donde se obtuvieron $5,69/5,50/5,41 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$ para S1/S2/S3, respectivamente (ver Tabla 63). Por tanto, la cantidad total de P recuperado se mantiene prácticamente constante en las tres simulaciones ($6 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$).

Por otra parte, tanto en S1 como en S2 y S3, la concentración de X_{pp} a la salida de la cámara de mezcla presentó un valor muy bajo ($2,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), de lo cual se induce que esta nueva configuración consigue un elevado rendimiento de extracción del P inorgánico. El caudal de biogás generado en el proceso de digestión se mantuvo alrededor de $1.700 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ en las tres simulaciones, valor similar al de las simulaciones S1, S2 y S3 del Escenario 0 (valores entre $1.739 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ y $1.785 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, ver Tabla 61).

Con respecto a la concentración de SST en la corriente a digestión ($SST_{Dig. An}$), la variación del parámetro $SST_{Fango Centr}$ provocó que en S1 se obtuviese un valor ($43.443 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ligeramente menor al que se observó en las simulaciones S2 ($44.604 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y S3 ($45.005 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Tal y como se ha mencionado en el apartado 4.2.1.1, la concentración de SST en la corriente a digestión no debe superar los $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Por tanto, con respecto a esta limitación, los parámetros operacionales fijados en S1 permitirían mantener un pequeño margen de seguridad, ya que con S2 y S3 la concentración de SST a digestión está muy cerca de sobrepasar el límite establecido. Cabe resaltar que se hizo una prueba con los mismos porcentajes de repartición de caudal y un 10% de $SST_{Fango Centr}$, donde la concentración de sólidos en la corriente a digestión anaerobia superaba notablemente la limitación de $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sin obtenerse ningún aumento en cuanto a la recuperación de P, por lo que se considera una prueba fallida y no se presenta como resultado.

En la simulación S4 se variaron los porcentajes de repartición de caudal, fijándolos en un 70% a digestión y un 30% a centrifuga. Así mismo, se fijaron los $SST_{Fango Centr}$ en un 6% con el objetivo de maximizar el $Q_{Sob. Centr}$. Se obtuvo un Q_{dig} de $77 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ y un Q_{centr} de $33 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$, observándose un aumento significativo en el caudal que va a centrífuga con respecto a las simulaciones anteriores. El $Q_{Sob. Centr}$ alcanzó un valor de $8 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$, mientras la concentración de $P\text{-PO}_4 \text{ Sob Centr}$ ($88,72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) aumentó ligeramente con respecto a S1, S2 y S3. Así, en S4 la cantidad de P recuperada en el sobrenadante de la centrífuga fue de $0,70 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$, ligeramente mayor con respecto a S1, S2 y S3. Sin embargo, la cantidad de $P\text{-PO}_4 \text{ Sob. Desh}$ para S4 se redujo ligeramente con respecto a S1, S2 y S3 ($5,25 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$). Esto se debe a que, aún al obtener prácticamente el mismo valor de concentración de $P\text{-PO}_4$ en el sobrenadante del deshidratador que en las simulaciones anteriores (promedio de $85 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), el aumento del $Q_{Sob. Centr}$ hace que el Q_{desh} se vea reducido, pasando de una media de $65 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en las simulaciones S1, S2 y S3 a un valor de $63 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en S4. Debido a ello, finalmente se obtuvo una cantidad de P global recuperado ($5,96 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$) ligeramente menor a la de las simulaciones anteriores, a pesar de haber aumentado el caudal que se envía a centrífuga. Por su parte, el caudal de biogás generado durante el proceso de digestión anaerobia permaneció alrededor de $1.700 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$. Con respecto a la concentración de SST en la corriente a digestión, en S4 se obtuvo un valor de $45.583 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, superando la limitación superior establecida para este parámetro ($45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sin obtenerse ninguna mejoría en cuanto a recuperación de P. Esto es debido a que se envía un mayor porcentaje de caudal a la centrífuga, concentrándose así más el fango que sale de la cámara de

mezcla, con respecto a las concentraciones obtenidas en S1, S2 y S3. Cabe mencionar que se hicieron pruebas con porcentajes de repartición de 55/45, 40/60 y 10/90, en las cuales no se observó una mayor recuperación de P a la obtenida con las simulaciones que se han detallado en los párrafos anteriores. Sin embargo, sí se observó un aumento en la concentración de sólidos a digestión que sobrepasaba el límite establecido de $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo que se consideraron pruebas fallidas que no se presentan como resultados.

En base a los resultados obtenidos, los **parámetros operacionales** de la simulación **S1** (Tabla 64) se fijaron como **óptimos** para esta **configuración** planteada en el **Escenario 1**. Esto se hizo así dado que pese a observarse resultados bastante similares con respecto a la recuperación de P en todas las simulaciones, en la simulación S1 se observó una menor concentración de los SST en la corriente a digestión, lo cual permite cierto margen de seguridad cara al proceso de digestión anaerobia.

Tabla 64. Condiciones operacionales óptimas del Escenario 1.

Parámetros	Valores
SST _{Fango Centr} (%)	6
%Q _{dig}	85
%Q _{centr}	15
Q _{dig} ($\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$)	81
Q _{centr} ($\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$)	14

Al igual que en el Escenario 0, en el apartado 7.3.2 de Anejos se recogen los caudales máxicos de P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol presentes en el sobrenadante de la centrífuga, en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido y en una hipotética corriente conjunta de ambos sobrenadantes, respectivamente (desde Tabla A 28 hasta Tabla A 30). Así mismo, se presentan las concentraciones de estos componentes en dicha corriente conjunta (Tabla A 31), junto con las relaciones molares Ca/P, N/P y Mg/P correspondientes a cada una de las tres corrientes evaluadas (desde Tabla A 32 hasta Tabla A 34). Los resultados obtenidos para la corriente conjunta muestran que las diferencias entre las simulaciones son relativamente pequeñas en cuanto a la cantidad de P recuperado en forma de P-PO₄, con valores comprendidos entre $5,96 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ y $6,04 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ y concentraciones entre $84,54 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $85,73 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Lo mismo sucede con las relaciones molares analizadas, por lo que se

procede a analizar las relaciones obtenidas para el escenario seleccionado como óptimo, es decir, S1. Desde el punto de vista químico, el escenario S1 presenta condiciones favorables para la precipitación selectiva de estruvita. La relación molar Ca/P obtenida es relativamente alta (0,71), lo que podría incrementar el riesgo de formación de fosfatos cálcicos no deseados. Por su parte, la elevada relación N/P (18,77) asegura una disponibilidad adecuada de N-NH₄. Aunque la relación Mg/P (0,22) es relativamente baja y podría actuar como factor limitante, esta limitación puede solventarse fácilmente mediante la adición controlada de magnesio, práctica común en sistemas reales de recuperación.

Por tanto, la **alternativa S1**, además de **permitir una recuperación eficaz de P** manteniendo la estabilidad del sistema, **proporciona unas relaciones molares adecuadas para una posterior cristalización de estruvita**, especialmente en cuanto al ratio Ca/P que destaca por ser el menor valor con respecto a las otras simulaciones consideradas como viables (S2 y S3).

4.2.2.1.3. COMPARATIVA ESCENARIO 0 Y ESCENARIO 1

Desde el punto de vista de la recuperación de P, el Escenario 0 ofrece un rendimiento significativamente superior al observado en el Escenario 1. En la simulación considerada como óptima para el Escenario 0 (S4), el caudal másico de P recuperado alcanzó un valor de 19,3 kg·d⁻¹, con una concentración de P-PO₄ de 99,09 mg·L⁻¹. No obstante, este buen rendimiento técnico presenta limitaciones operativas importantes. El principal inconveniente del Escenario 0 radica en la inestabilidad de la unidad del espesador primario, donde se observaron problemas de desbordamiento que comprometen la viabilidad real del sistema. Ciertamente, en S4 se pudo controlar la altura del manto de fangos en el espesador primario, pero en cuanto se intentó forzar un poco más el sistema (S5 y S6) se detectó enseguida el desbordamiento de esta unidad. En contraposición, el Escenario 1 (en el que se seleccionó la simulación S1) presenta una recuperación de P significativamente menor, con un caudal másico de P-PO₄ de 6,04 kg·d⁻¹ y una concentración de P-PO₄ de 85,72 mg·L⁻¹ en la corriente conjunta destinada al cristalizador. A pesar de este menor rendimiento, su configuración ofrece importantes ventajas desde el punto de vista operativo. La elutriación del fango se realiza directamente en la centrífuga, evitando los potenciales problemas operacionales del Escenario 0, causados por el desbordamiento del espesador.

Por su parte, el promedio del caudal de biogás que se genera en S4-Escenario 0 es similar al del Escenario 1 (S1), encontrándose en ambos casos alrededor de $1.700 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$.

Desde el punto de vista de la cristalización de P en forma de estruvita, atendiendo a las relaciones molares Ca/P, N/P y Mg/P, en lo que respecta a la relación Ca/P, ambos escenarios muestran valores similares entre sí y cercanos a un coeficiente estequiométrico de 1: 0,78 en el Escenario 0 y 0,71 en el Escenario 1. Aunque este último valor resulta algo más favorable en términos de selectividad hacia la estruvita, la diferencia no es especialmente significativa. En cualquier caso, estos valores indican una posible competencia con la formación de fosfatos cálcicos, por lo que será necesario un control cuidadoso del proceso para evitar su precipitación y asegurar una recuperación eficiente del P como estruvita. En cuanto a la relación N/P, los dos escenarios ofrecen condiciones adecuadas para la formación de estruvita, al garantizar una buena disponibilidad de N-NH_4 : en el Escenario 0, el valor se sitúa en 7,31, lo que ya resulta suficiente para el proceso; mientras que en el Escenario 1 es de 18,77, proporcionando un margen adicional de seguridad frente a posibles variaciones en la composición del fango. Respecto a la relación Mg/P, ambos escenarios presentan valores por debajo del ideal estequiométrico (ratio de 1), lo que sugiere la posible necesidad de una ligera adición de Mg para optimizar la cristalización de estruvita. En el Escenario 0, el valor se sitúa en 0,36, y en el Escenario 1 en 0,22.

En conjunto, tanto el Escenario 0 como el Escenario 1 generan corrientes enriquecidas en P que pueden servir como base adecuada para su cristalización en forma de estruvita. No obstante, el Escenario 0 presenta una mayor carga másica de P, lo que lo posiciona como una opción más favorable desde el punto de vista del rendimiento de recuperación de P del proceso.

4.2.2.2. ESCENARIOS CON HIDRÓLISIS ENZIMÁTICAS

Una vez completadas las simulaciones del Escenario 0 y el Escenario 1, se procedió a realizar las simulaciones de los escenarios CON hidrólisis enzimática. Para ello, partiendo de los mismos esquemas que se tenían para el Escenario 0 y el Escenario 1, se realizan las siguientes simulaciones del Escenario 2 y el Escenario 3.

En relación con la hidrólisis enzimática, los ensayos realizados a escala de laboratorio descritos en el apartado 4.1 evidencian que al aplicar enzimas hidrolíticas sobre el fango procedente de la cámara de mezcla se produce una hidrólisis adicional del P orgánico asociado al fango de la cámara de mezcla, pudiendo alcanzarse liberaciones de $P-PO_4$ de entre 24 y 77 $mgP \cdot L^{-1}$ (dosis R25 de los ensayos correspondientes al lote “M”) adicionales a las obtenidas habitualmente en la cámara de mezcla. Esta liberación adicional se incorporó en las simulaciones de los Escenarios 2 y 3, seleccionando el valor máximo observado ($\sim 80 \text{ mgP} \cdot L^{-1}$) con el fin de representar un caso potencialmente favorable en términos de recuperación de P. Para ello, fue necesario el ajuste de los parámetros cinéticos asociados a la hidrólisis de las bacterias acidogénicas del modelo BNMR2 respecto a los valores fijados en la validación del modelo (ver apartado 4.2.1).

4.2.2.2.1. ESCENARIO 2

En este escenario, al igual que en el Escenario 0, el fango de la cámara de mezcla (fango mixto) es recirculado al espesador de gravedad (espesador primario) de la EDAR, en el cual los componentes solubles presentes en el fango mixto (incluido el fosfato) serán lavados y extraídos con el sobrenadante del espesador. El fango espesado se distribuye una parte a digestión y otra a la cámara de mezcla. El sobrenadante del espesador primario, enriquecido en $P-PO_4$, pasaría a usarse en un proceso de cristalización, junto con el sobrenadante generado en la etapa de deshidratación de fangos. La diferencia principal con respecto al Escenario 0, es que en este caso se simula el comportamiento de la cámara de mezcla considerando un hipotético aporte de enzimas que provocaría la hidrólisis de una parte del P orgánico presente en el fango, incrementando consecuentemente la concentración de $P-PO_4$ a elutriar.

Para simular la liberación de P orgánico en la cámara de mezcla asociado a la acción de la enzima se realizaron las siguientes modificaciones de los parámetros cinéticos correspondientes a las bacterias acidogénicas:

- K_H : Constante de hidrólisis de las bacterias acidogénicas (k_H). Esta constante se fija en un valor de 1.000 d^{-1} .
 - μ_{ACID} : Velocidad de crecimiento de las bacterias acidogénicas (μ_{ACID}) en el digestor anaerobio. Este parámetro se fija en un valor de 3 d^{-1} .
-

- K_x : Constante de semisaturación de la materia orgánica. Esta constante se fija en un valor de $25 \text{ g DQO} \cdot \text{g DQO}^{-1}$.
- K_a : Constante de semisaturación para S_A . Esta constante se fija en un valor de $6.500 \text{ g DQO} \cdot \text{m}^{-3}$.

Estas modificaciones se realizaron tanto en la unidad funcional cámara de mezcla, como en el espesador primario. Esto se debe a que las enzimas, una vez introducidas en la cámara de mezcla, serán arrastradas hacia el espesador primario y permanecerán en el sistema de elutriación configurado.

Para el desarrollo del Escenario 2 se tomaron como base las mismas premisas empleadas en el Escenario 0, incluyendo tanto las variables operacionales como sus respectivos intervalos iniciales de operación, definidos en el apartado 4.2.2.1.1. Asimismo, la discusión de resultados se centrará en las mismas variables analizadas en dicho apartado, con el fin de facilitar la comparación entre escenarios.

Las simulaciones que se presentan en la Tabla 65 se realizaron fijando el parámetro IVF en $27 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, valor utilizado en el Escenario 0. Se han utilizado los siguientes porcentajes de repartición de los caudales a digestión y elutriación ($\%Q_{\text{dig}}$ y $\%Q_{\text{elut}}$): 85 y 15%, 70 y 30%, 55 y 45%. En este escenario, la ratio Q_{ext}/Q_e se ajustó con respecto a la utilizada en el escenario sin hidrólisis enzimática (intervalo utilizado en el Escenario 0: 0,5-0,7), con el objetivo de evitar el desbordamiento del espesador primario, utilizándose valores entre 0,3 y 0,6 según el caso.

Tabla 65. Valores de los parámetros fijados en espesador primario, porcentajes de repartición a digestión y a cámara mezcla del Escenario 2 y principales resultados obtenidos.

Escenario 2	S1	S2	S3	S4
Parámetros operacionales fijados				
IVF Esp. 1°	27	27	27	27
%Q _{dig}	85	85	70	55
%Q _{elut}	15	15	30	45
Q _{ext} /Q _e	0,300	0,310	0,365	0,600
Q _{dig} (m ³ ·d ⁻¹)	56	58	60	94
Q _{elut} (m ³ ·d ⁻¹)	36	36	52	104
Parámetros observados				
XPP Salida CM (mg·L ⁻¹)	2,1	2,1	2,2	2,4
Q _{Sob. Esp. 1°} (m ³ ·d ⁻¹)	153	151	149	114
P-PO ₄ Sob. Esp. 1° (mg·L ⁻¹)	181	167	169	145
P-PO ₄ recup Sob. Esp. 1° (kg·d ⁻¹)	27,7	25,3	25,2	16,6
h (m)	2,0	1,5	1,5	3,0
SST _{Sob. Esp. 1°} (mg·L ⁻¹)	779	778	824	932
SST _{Dig. An} (mg·L ⁻¹)	38.813	37.716	36.509	35.601
Q _{biogás} (m ³ ·d ⁻¹)	751	1.054	1.013	1.627
Q _{Sob.Desh} (m ³ ·d ⁻¹)	42	44	47	80
P-PO ₄ Sob.Desh (mg·L ⁻¹)	23	38	39	45
P- PO ₄ recup.Sob.Desh (kg·d ⁻¹)	1,0	1,7	1,8	3,6

Como se puede observar en la Tabla 65, en las simulaciones S1 y S2 se utilizaron los mismos porcentajes de repartición (85% a digestión y 15% a elutriación) y la ratio Q_{ext}/Q_e se varía de 0,3 (S1) a 0,31 (S2). Esto condujo a un Q_{dig} de $56 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ y un Q_{elut} de $36 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ para S1, mientras en S2 se obtuvieron unos caudales de 58 y $36 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Estos caudales se encuentran dentro de los intervalos iniciales de operación. La concentración de X_{PP} a la salida de la cámara de mezcla se mantuvo en un valor bajo para ambas simulaciones ($2,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), de lo que se induce que el sistema de elutriación consigue un elevado rendimiento de recuperación del P inorgánico.

Con respecto a S1, la altura del manto de fangos llega hasta 2 m, menor al obtenido en S1-Escenario 0 (3 m), alcanzándose un valor $779 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de SST en la corriente sobrenadante del espesador primario. La menor altura del manto de fangos que se observó en S1, con respecto a S1-Escenario 0, se atribuye a la reducción de la ratio Q_{ext}/Q_e .

En el caso de S2, la altura del manto de fangos se mantiene alrededor de 1,5 m (muy similar a la observada en S2- Escenario 0: 1,4 m, ver Tabla 61).

Con respecto al caudal de biogás generado en el proceso de digestión anaerobia, en S1 se alcanzó un valor de $750 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, observándose una reducción significativa con respecto al caudal de biogás obtenido en S1-Escenario 0, que se mantenía alrededor de $1.700 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ (ver Tabla 61). En S2 se consiguió aumentar este valor hasta $1.054 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, aunque sigue siendo significativamente menor al obtenido en S2-Escenario 0 ($1.785 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, ver Tabla 61). Esta disminución en el caudal de biogás se atribuye a la elevada solubilización de SSV biodegradables que se produce en este escenario, como consecuencia del alto valor asignado a la constante de hidrólisis de las bacterias acidogénicas (k_H) en el modelo. Este parámetro promueve una rápida solubilización de la materia orgánica particulada en la cámara de mezcla. Como resultado, se genera una elevada concentración de DQO soluble ($14.532 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en S1 y $11.263 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en S2) en la corriente sobrenadante del espesador primario. Según el balance de DQO, esto implica una pérdida de $2.224 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$ DQO soluble se escapan por el sobrenadante del espesador primario, en el caso de S1, y $1.702 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$, en el caso de S2. Este hecho afecta directamente al caudal volumétrico de biogás, que disminuye significativamente con respecto a la producción de biogás en el Escenario 0. Del mismo modo, al analizar el balance de SSV a la entrada del digestor, se observa que mientras en el Escenario 0 se alcanzó un promedio de $2.760 \text{ kg SSV} \cdot \text{d}^{-1}$ a

la entrada del digestor anaerobio, en el Escenario 2 este valor se redujo a $1.540 \text{ kg SSV}\cdot\text{d}^{-1}$. En conjunto, la menor disponibilidad de DQO y SSV a la entrada al digestor implica la reducción del caudal volumétrico de biogás mencionado.

Finalmente, la cantidad total de P-PO_4 recuperado en las corrientes sobrenadante del espesador primario y del deshidratador de fango digerido fue ligeramente mayor en S1 ($27,7$ y $1,0 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente) que en S2 ($25,3$ y $1,7 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente). Por lo tanto, el ligero aumento de $0,30$ (S1) a $0,31$ (S2) de la ratio Q_{ext}/Q_e en el espesador primario condujo a un valor de recuperación del P-PO_4 ligeramente menor en S2. Sin embargo, como ya se ha observado en el apartado 4.2.2.1.1, una ratio Q_{ext}/Q_e mayor permite mantener más controlado el manto de fangos de la unidad de espesamiento primario.

En la simulación S3 se mantuvo el IVF fijado anteriormente ($27 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) mientras se variaban los porcentajes de repartición de caudal, fijándolos en un 70% a digestión y un 30% a elutriación. Así mismo, se fijó la ratio Q_{ext}/Q_e en $0,365$ obteniéndose un Q_{dig} de $60 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ y un Q_{elut} de $52 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$. Ambos caudales se encuentran dentro de los intervalos iniciales de operación fijados en el apartado 4.2.2.1.1.

Como se puede observar en la Tabla 65, en S3 la concentración de X_{PP} a la salida de la cámara de mezcla sigue manteniéndose en un valor bastante bajo ($2,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), consiguiéndose por tanto un rendimiento adecuado de recuperación del P inorgánico. Con respecto a los SST a digestión, este reparto de caudales produjo una menor concentración del fango primario espesado con respecto a la obtenida en S1 y S2, obteniéndose un valor de $36.509 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Esto repercutió en el caudal de biogás generado, que se ve ligeramente reducido con respecto a S2 ($1.013 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$). A la vez se obtiene una altura del manto de fangos alrededor de $1,5 \text{ m}$ por lo que hay un mayor control frente a posibles desbordamientos del espesador primario. Por último, la cantidad total de P-PO_4 recuperado en las corrientes sobrenadante del espesador primario y del deshidratador de fango digerido fue de $25,2$ y $1,8 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente, es decir, prácticamente igual a la que se obtuvo en la simulación S2. Se hicieron diversas pruebas con ratios Q_{ext}/Q_e menores y mayores al fijado en esta simulación. En todas las pruebas con ratios Q_{ext}/Q_e menores se observó el desbordamiento de la unidad de espesamiento primario. En las pruebas con ratios mayores, aunque el proceso de digestión anaerobia se veía

favorecido, la cantidad de P recuperado era menor. Esto es debido a que con una ratio Q_{ext}/Q_e mayor, la hidrólisis de SSV se reduce. Por tanto, estas pruebas se consideran fallidas y no se presentan como parte de los resultados.

En la simulación S4 se mantuvo el IVF fijado anteriormente ($27 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) y se variaron los porcentajes de repartición de caudal, fijándolos en un 55% a digestión y un 45% a elutriación. Así mismo, se fijó la ratio Q_{ext}/Q_e en 0,6 obteniéndose un Q_{dig} de $94 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ y un Q_{elut} de $104 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$. De acuerdo con los intervalos de operación fijados, el Q_{elut} en esta simulación superó el valor máximo recomendable, lo que habría podido provocar desbordamientos en el espesador primario. Esta prueba se realizó en base a los resultados obtenidos en las simulaciones S2 y S3, en las que no se produjeron desbordamientos del espesador primario. Con esta prueba se pretendía observar si, aun con un Q_{elut} mayor al establecido, podía mantenerse bajo control el manto de fangos. Así mismo, al trabajar con dos digestores y poder llevar más caudal a digestión, se tiene mayor margen con el caudal que se lleva a elutriación del que se estableció como premisa de partida.

Así, en S4 se obtuvo un caudal de biogás mayor al alcanzado en las simulaciones anteriores ($1.687 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$). Este aumento se debe, de nuevo, a la reducción de la solubilización en el espesador, provocada por la mayor ratio Q_{ext}/Q_e , que conllevó una menor pérdida de DQO soluble por el sobrenadante. Como resultado, más materia orgánica entró al digestor anaerobio ($2.714 \text{ kg SSV}\cdot\text{d}^{-1}$), un valor muy cercano al obtenido en el Escenario 0.

Sin embargo, esta mejora en la producción de biogás se consiguió a costa de una menor eficiencia en la recuperación de P: $16,6 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ por el sobrenadante del espesador primario y $3,6 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ por el del deshidratador, valores notablemente inferiores a los de S2 y S3. Esta disminución se explica, nuevamente, por la menor hidrólisis enzimática, resultado del menor tiempo de retención en el espesador primario. Por última, los parámetros operacionales establecidos en la simulación S4 provocaron el desbordamiento del espesador primario, alcanzándose una altura del manto de fangos de 3,0 m. Debido a esta condición operativa no deseada, dicha simulación se considera no válida y, por tanto, descartada como opción viable.

Según lo comentado anteriormente, los **parámetros operacionales** utilizados en la **simulación S2** (Tabla 66) se fijaron como los óptimos para este escenario. Este conjunto de parámetros operacionales permitía: recuperar una cantidad total de P razonable ($27 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$) y bastante similar a la obtenido en el resto de las simulaciones de este escenario; mantener una altura del manto de fangos adecuada (1,5 m) y, por tanto, minimizar los problemas por desbordamientos del espesador primario; así como generar un caudal de biogás mayor al de las demás simulaciones viables ($1.054 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en S2 frente a $751 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ y $1.013 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en S1 y S3, respectivamente) (ver Tabla 65).

Tabla 66. Condiciones operacionales óptimas del escenario 2.

Parámetros	Valores
IVF Esp. 1°	27
%Q _{dig}	85
%Q _{elut}	15
Q _{dig} ($\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$)	58
Q _{elut} ($\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$)	36

Al igual que en el Escenario 0, cara a tener en cuenta también la recuperación del P en forma de estruvita, en el apartado 7.3.3 de Anejos se presentan los caudales másicos de P-PO₄, N-NH₄, Mg soluble (Mg sol), Ca soluble (Ca sol) y K soluble (K sol) correspondientes al sobrenadante del espesador, al del deshidratador de fango digerido y a una hipotética corriente combinada de ambos (desde Tabla A 35 hasta Tabla A 38). Además, se presentan las concentraciones de estos mismos componentes en la corriente conjunta, así como las relaciones molares Ca/P, N/P y Mg/P en cada una de las tres corrientes analizadas (desde Tabla A 38 hasta Tabla A 41).

En cuanto a las relaciones molares de la corriente conjunta formada por los sobrenadantes del espesador primario y del deshidratador de fango digerido (Tabla A 41), los tres escenarios (S1, S2 y S3) presentan valores muy similares: Ca/P entre 0,57 y 0,60; N/P entre 5,67 y 5,77; y Mg/P entre 0,28 y 0,30. Estas similitudes indican que no hay diferencias químicas significativas entre escenarios, permitiendo centrar el análisis comparativo en aspectos operativos y de rendimiento.

En particular, en la simulación S2, las relaciones molares entre los principales iones implicados en la formación de estruvita se sitúan en rangos adecuados. La relación Mg/P (0,30) es inferior a la estequiométrica ideal (1), pero común en sistemas reales, donde se contempla la dosificación externa de magnesio. La relación N/P (5,74) asegura una disponibilidad suficiente de N-NH_4^+ sin necesidad de aporte adicional, mientras que la relación Ca/P (0,60) podría favorecer la precipitación de fosfatos cálcicos si no se controla adecuadamente.

En este contexto, la **alternativa S2** se posiciona como la opción óptima dentro del Escenario 2, al combinar una **adecuada recuperación de P y concentración de P-PO₄** en la corriente conjunta, **mayor producción de biogás** y una altura del **manto de fango estable**. Además, **los ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P** en este escenario se encuentran en **valores apropiados para favorecer la precipitación de estruvita**.

4.2.2.2.2. ESCENARIO 3

En este esquema, al igual que en el Escenario 1, se planteó la elutriación del fango procedente de la cámara de mezcla mediante una centrífuga, a partir del cual se extraería el P potencialmente recuperable a través de su corriente sobrenadante. Partiendo de la configuración del Escenario 1, en el Escenario 3 se simuló el efecto de la adición de enzimas hidrolíticas en la cámara de mezcla, con el objetivo de evaluar si esta intervención permite aumentar la cantidad de P recuperado en el sobrenadante del espesador, en comparación con la obtenida previamente en el Escenario 1.

Para la simulación de la hidrólisis enzimática se mantuvieron las modificaciones en los parámetros cinéticos que se realizaron en el Escenario 2 (ver apartado 4.2.2.2.1), correspondientes a las bacterias acidogénicas. En este caso, dichas modificaciones se realizaron únicamente en la unidad funcional cámara de mezcla, ya que a diferencia del Escenario 2, no se produce un arrastre de las enzimas al espesador primario.

Para las simulaciones del Escenario 3 se tuvieron en cuenta las mismas premisas que las utilizadas en el Escenario 1. De este modo, tanto las variables operacionales como sus respectivos intervalos, definidos en el apartado 4.2.2.1.2., se mantuvieron para el análisis de este escenario. Así mismo, la discusión se basó en los resultados de las mismas variables consideradas en dicho apartado.

A partir de estas premisas, se llevaron a cabo las simulaciones resumidas en la Tabla 67, utilizando diferentes porcentajes de repartición del caudal hacia digestión y centrífuga (utilizado para elutriar el fango): 85 y 15% y 70 y 30%. Así mismo, se varió el porcentaje de sólidos en el fango, parámetro operacional que se asigna a la centrífuga, dentro del intervalo previamente establecido (de un 6 a un 9%).

Como se puede observar en la Tabla 67, en las simulaciones S1, S2 y S3 se utilizaron los mismos porcentajes de repartición (85% a digestión y 15% a centrífuga), variando el valor del parámetro $SST_{\text{Fango Centr}}$ de un 6% a un 9%. Para estas tres simulaciones, se obtuvieron caudales a digestión y a centrífuga muy similares. En el caso de S1 el Q_{dig} fue de $78 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, en S2 de $77 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ y en S3 de $76 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. El caudal a centrífuga prácticamente fue el mismo en las tres simulaciones (con un promedio de $14 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$). No obstante, el incremento de $SST_{\text{Fango Centr}}$ de un 6% a un 9% aumentó ligeramente el caudal sobrenadante de la centrífuga. Así, en el caso de S1, en el que se fijó un 6% de $SST_{\text{Fango Centr}}$, se obtuvo un $Q_{\text{Sob. Centr.}}$ de $7 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. En S2 este parámetro se fijó en un 8%, lo cual elevó el $Q_{\text{Sob. Centr.}}$ ligeramente ($8 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$). Finalmente, en S3 $SST_{\text{Fango Centr}}$ fue del 9% alcanzándose un valor del $Q_{\text{Sob. Centr.}}$ de $9 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$.

Al igual que en las simulaciones del Escenario 1, se observó que la recuperación de P en la corriente sobrenadante de la centrífuga depende completamente de maximizar el $Q_{\text{Sob. Centr.}}$, ya que la concentración de $\text{P-PO}_4_{\text{Sob Centr.}}$ se mantuvo constante en todas las simulaciones.

En este sentido, la simulación S1, que operó con el menor valor de $SST_{\text{Fango Centr}}$, presentó una recuperación de P-PO_4 en el sobrenadante de la centrífuga de $0,77 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$. En S2, esta cantidad aumentó ligeramente hasta $0,95 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$, y en S3 se alcanzó el valor más alto, con $1,01 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$. Sin embargo, esta recuperación sigue siendo poco significativa frente a la obtenida en la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido. En dicha corriente, se recuperaron $5,1 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$ de P en S1, mientras que en S2 este valor descendió a $4,3 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$. (ver Tabla 67). En conjunto, la recuperación total de P-PO_4 (suma de corrientes sobrenadantes de la centrífuga y del deshidratador del fango digerido) fue de $5,8 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$ en S1 y S3, ligeramente inferior en S2 ($5,2 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$).

Tabla 67. Valores de los parámetros fijados en espesador primario, porcentajes de repartición a digestión y centrifuga del Escenario 3 y principales resultados obtenidos.

Escenario 3	S1	S2	S3	S4
Parámetros operacionales fijados				
SST_{Fango Centr} (%)	6	8	9	6
%Q ND2-Dig	85	85	85	70
%Q ND2-Centrífuga	15	15	15	30
Q_{dig} (m³·d⁻¹)	78	77	76	72
Q_{centr} (m³·d⁻¹)	14	14	13	31
Parámetros observados				
X_{PP Salida CM} (mg·L⁻¹)	2,4	2,4	2,4	2,4
Q_{Sob. Centr} (m³·d⁻¹)	7	8	9	13
P-PO_{4 Sob Centr} (mg·L⁻¹)	117,27	117,47	117,53	118,08
P-PO_{4 recup Sob. Centr} (kg·d⁻¹)	0,77	0,95	1,01	2,33
SST_{Dig. An.} (mg·L⁻¹)	31.640	32.248	32.455	34.400
Q_{biogás} (m³·d⁻¹)	1.725	1.694	1.687	1.605
Q_{Sob. Desh} (m³·d⁻¹)	64	62	62	57
P-PO_{4 Sob. Desh} (mg·L⁻¹)	79	69	78	65
P- PO_{4 Sob. Desh.} (kg·d⁻¹)	5,1	4,3	4,8	3,3

Comparando con el Escenario 1, se observa que, aunque la concentración de $P-PO_4$ en el sobrenadante de la centrífuga aumentó significativamente ($117 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el Escenario 3 frente a $88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el Escenario 1), la recuperación total de P fue menor en el Escenario 3 (promedio de $6 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ en Escenario 1 y de $5,5 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ en Escenario 3, ver Tabla A 30 y Tabla A 44). Esto se debe a que la mayor hidrólisis generada por la adición enzimática en el Escenario 3 provocó una mayor liberación de $P-PO_4$ en la etapa inicial, lo que a su vez redujo la cantidad de P que llegó a la etapa de deshidratación del digerido. Como resultado, la recuperación en el deshidratador disminuyó de un promedio de $5,5 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ en el Escenario 1 a $4,7 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ en el Escenario 3.

El caudal de biogás generado en el proceso de digestión anaerobia se mantuvo alrededor de $1.700 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en las tres simulaciones (S1, S2 y S3), con valores ligeramente menores a los observados en el Escenario 1 (valores entre $1.759 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ y $1.782 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$, ver Tabla 64). Esto es debido a la elevada solubilización de SSV provocada por el incremento del valor de la constante cinética de hidrólisis (k_H) en este escenario. Como consecuencia, una elevada concentración de DQO soluble (S_F) se escapa por la corriente sobrenadante de la centrífuga. Así, al realizarse el balance de SSV, en las simulaciones S1, S2 y S3 del Escenario 1, se tenía un promedio de $2.854 \text{ kg SSV}\cdot\text{d}^{-1}$ a la entrada del digestor anaerobio, mientras en el caso de las simulaciones S1, S2 y S3 del Escenario 3 se obtuvo un caudal másico de SSV de $1.820 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$. No obstante, este hecho no afecta significativamente al caudal volumétrico de biogás. Esto se debe a que, pese a tener una concentración elevada de S_F en la corriente sobrenadante de la centrífuga ($32291 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en S1, $32334 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en S2 y $32348 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en S3), el caudal de esta es mínimo ($7 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en S1, $8 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en S2 y $9 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en S3), por lo que a diferencia del Escenario 2, no se produce un escape significativo de caudal másico de DQO soluble por esta corriente ($211 \text{ kg DQO}\cdot\text{d}^{-1}$ en S1, $261 \text{ kg DQO}\cdot\text{d}^{-1}$ en S2 y $278 \text{ kg DQO}\cdot\text{d}^{-1}$ en S3).

En la simulación S4 se variaron los porcentajes de repartición de caudal, fijándolos en un 70% a digestión y un 30% a centrífuga. Así mismo, se fijó el $SST_{\text{Fango Centr}}$ en un 6% con el objetivo de maximizar el $Q_{\text{Sob. Desh.}}$. Esta estrategia se basó en los resultados previos, donde se observó que incrementar el $Q_{\text{Sob. Centr.}}$ no se traducía en una mejora significativa en la recuperación de P, mientras que aumentar el $Q_{\text{Sob. Desh.}}$ sí permitía aumentar la cantidad global de P recuperado, aunque sea ligeramente. Se obtuvo un Q_{dig} de 72 y un $Q_{\text{centr.}}$ de $31 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$, observándose un aumento significativo

en el caudal que va a centrífuga con respecto a las simulaciones anteriores. El $Q_{\text{Sob. Centr.}}$ alcanzó un valor de $13 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, mientras la concentración de $\text{P-PO}_4 \text{ Sob Centr.}$ aumentó ligeramente a un valor de $118,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Así, en S4 la cantidad de P recuperada en el sobrenadante de la centrífuga fue de $2,33 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$, siendo el mejor resultado obtenido para esta corriente, con respecto a las simulaciones S1, S2 y S3. La cantidad de P total recuperada en las corrientes sobrenadante de la centrífuga y del deshidratador de fango digerido fue de $5,30 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$. Por tanto, se obtuvo una menor cantidad de P recuperado, con respecto a las simulaciones anteriores, a pesar de haber aumentado el caudal que se envía a centrífuga. Por su parte, el caudal de biogás generado permaneció alrededor de $1.700 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, al igual que en las anteriores simulaciones. Cabe mencionar que se hicieron pruebas con porcentajes de repartición (digestión/centrífuga) de 55/45, 40/60 y 10/90, en los cuales no se observó una mayor recuperación de P a la obtenida con las simulaciones que se han detallado en los párrafos anteriores. Por el contrario, al aumentar el porcentaje de caudal que va a la centrífuga, se obtenía cada vez una menor recuperación de P. Esto es debido al reparto de caudales, ya que, al aumentar el caudal a elutriación, el $Q_{\text{desh.}}$ se ve reducido. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la cantidad de P recuperada en el deshidratador es la que pesa realmente en el cómputo global, por lo que al reducirse el $Q_{\text{desh.}}$ se reduce a su vez la cantidad de P recuperado en la corriente sobrenadante del deshidratador y, por tanto, la recuperación total de P es menor. Por lo tanto, estos ensayos se consideran fallidos y no se presentan como resultados.

En base a todo lo mencionado, se escogieron los **parámetros operacionales** utilizados en la simulación **S1** (Tabla 68) se fijaron como **óptimos** para esta configuración planteada en el **Escenario 3**. Este conjunto de parámetros operacionales permitió obtener la **mayor cantidad global de P recuperado** en el Escenario 3, frente al resto de simulaciones con excepción de la S3. En esta última, la recuperación global de P fue exactamente la misma que la obtenida en S1. Para elegir entre S1 y S3 se tuvo en cuenta que, en el caso de S1, la centrífuga alcanzó un menor porcentaje de sólidos en fango, con respecto a S3 (un **7%** frente a un 9%). Por tanto, el **consumo energético y de reactivos en la centrífuga** será **menor** en S1, por lo que resulta una mejor opción frente a S3.

Tabla 68. Condiciones operacionales óptimas del escenario 3.

Parámetros	Valores
SST _{Fango Centr} (%)	6
%Q _{dig}	85
%Q _{centr}	15
Q _{dig} (m ³ ·d ⁻¹)	78
Q _{centr} (m ³ ·d ⁻¹)	14

Al igual que en el Escenario 1, en el apartado 7.3.4 de Anejos se recogen los caudales máxicos de P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol presentes en el sobrenadante del espesador, en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido y en una hipotética corriente conjunta de ambos sobrenadantes, respectivamente (desde Tabla A 42 hasta Tabla A 44). Así mismo, se presentan las concentraciones de estos componentes en dicha corriente conjunta, junto con las relaciones molares Ca/P, N/P y Mg/P correspondientes a cada una de las tres corrientes evaluadas (desde Tabla A 45 hasta Tabla A 48). Según estos resultados, las simulaciones S1 y S3 ofrecieron los mejores valores de caudal máxico y concentración de P-PO₄ en la corriente conjunta a enviar al cristalizador, ambos con 5,8 kg·d⁻¹ y 82,2 mg·L⁻¹. No obstante, como ya se ha mencionado, se seleccionó S1 como opción óptima, por lo que se procede a analizar en base a esta simulación. Desde el punto de vista químico, S1 presenta condiciones favorables para la precipitación de estruvita. La relación molar Ca/P es de 0,75, un valor considerablemente alto que puede promover el riesgo de formación de fosfatos cálcicos. La relación N/P es elevada (19,56), lo que asegura una abundante disponibilidad de N-NH₄. La relación Mg/P se sitúa en 0,24, por debajo del ideal estequiométrico (1), pero podría corregirse fácilmente mediante una dosificación controlada de Mg.

En resumen, la **alternativa S1**, no solo **permite una recuperación eficiente de P** manteniendo la estabilidad del sistema, sino que también **presenta relaciones molares favorables** para la posterior **cristalización de estruvita**. Además, al alcanzarse un menor contenido de SST en el fango a la salida de la centrífuga, **se reduce tanto el consumo energético como el uso de reactivos**.

4.2.2.2.3. COMPARATIVA ESCENARIO 2 Y ESCENARIO 3

Desde el punto de vista de la recuperación de P, el Escenario 2 presenta un rendimiento superior. La simulación S2, seleccionada como la óptima de este escenario, alcanza el valor de recuperación total de P, con $27,0 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ y una concentración de $138,13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de P-PO₄ en la corriente conjunta (sobrenadante del espesador primario más el del deshidratador de fango digerido).

Por su parte, el Escenario 3 (simulación S1, seleccionada como la óptima para este escenario) presenta valores de recuperación más reducidos, con un caudal másico de P-PO₄ de $5,8 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$ y una concentración de $82,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en la corriente conjunta (sobrenadante de la centrífuga más el del deshidratador de fango digerido). A pesar de esta menor recuperación absoluta, su concentración sigue siendo relevante para someter esta corriente a un proceso de cristalización posterior.

En cuanto a la producción de biogás, en el Escenario 3 se obtuvo un valor mayor al del Escenario 2: $1.700 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en Escenario 3 frente a $1.054 \text{ m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ en Escenario 2. Esta diferencia puede representar una ventaja en términos de eficiencia energética y aprovechamiento del recurso, aunque debe sopesarse frente a la menor recuperación de P.

Desde el punto de vista químico, ambos escenarios ofrecen condiciones razonables para la precipitación de estruvita, aunque con diferencias relevantes. En el Escenario 2, las relaciones molares Ca/P ($\approx 0,60$), N/P ($\approx 5,74$) y Mg/P ($\approx 0,30$) se encuentran alejadas de los valores estequiométricos óptimos para la formación eficiente de estruvita (1:1:1 para Mg:P:N). En particular, la relación Mg/P está claramente por debajo del valor ideal, lo que indica la necesidad de una dosificación externa de Mg para favorecer la precipitación. Por su parte, la relación Ca/P, aunque no excesivamente alta, podría favorecer la formación competitiva de fosfatos cálcicos si no se controla adecuadamente, por lo que debe mantenerse bajo vigilancia para garantizar la selectividad del proceso hacia la estruvita.

En el Escenario 3, las condiciones químicas presentan mayores contrastes: la relación N/P es mucho más elevada (19,56), lo que asegura una alta disponibilidad de N-NH₄, mientras que la relación Mg/P es algo inferior (0,24) y la relación Ca/P alcanza 0,75, un valor considerablemente alto que aumenta

el riesgo de precipitación de compuestos cálcicos. Esto implica que será necesario controlar cuidadosamente la dosificación de Mg y minimizar el impacto del Ca para favorecer la formación de estruvita.

En conjunto, el Escenario 2 (S2) se muestra como la opción más robusta desde el punto de vista de la recuperación de P, ya que permite obtener un mayor caudal y una mayor concentración de P-PO₄ en la corriente enviada al cristalizador. Además, las condiciones químicas, aunque requieren ajustar la cantidad de Mg, son adecuadas para facilitar la formación de estruvita.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el Escenario 3 (S1) se produce bastante más biogás, lo que puede suponer una ventaja energética y económica. Por tanto, será necesario valorar si la mayor recuperación de P en el Escenario 2 (y el posible beneficio por la obtención de estruvita) compensa la menor producción de biogás frente al Escenario 3.

4.2.2.3. COMPARATIVA DE LAS SIMULACIONES REALIZADAS

En la Tabla 69 se presentan, a modo de resumen, los parámetros operacionales escogidos como opción óptima del Escenario 0 y del Escenario 2 (Escenario 0+hidrólisis enzimática) junto con una serie de resultados obtenidos como: la altura del manto de fangos (h), parámetro a tener en cuenta de cara a prevenir posibles problemas de desbordamiento; el caudal másico global de P recuperado; y el caudal de biogás (Q_{biogás}).

Tabla 69. Condiciones operacionales y características de las corrientes de recuperación para los Escenarios 0 y 2

Parámetro	Escenario 0	Escenario 2
%Q _{dig}	55	85
%Q _{elut}	45	15
Q _{dig} (m ³ ·d ⁻¹)	94	58
Q _{elut} (m ³ ·d ⁻¹)	104	36
h (m)	2,0	1,5

Q Sob. Esp. 1° ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	114	151
P-PO₄ Sob. Esp. 1° ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	136	167
Q Sob.Desh. ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	80	44
P-PO₄ Sob.Desh. ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	46	38
P-PO₄ recup. global ($\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$)	19	27
Qbiogás ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	1.687	1.054

Como se muestra en la Tabla 69, la altura del manto de fangos es más estable en el Escenario 2, lo que se debe a una mayor solubilización de los SSV como resultado de la hidrólisis enzimática aplicada en la cámara de mezcla. Esta intensificación del proceso hidrolítico reduce la cantidad de sólidos recirculados al favorecer su degradación temprana, lo que alivia la carga en el espesador primario y contribuye a mantener una altura de manto más controlada. Además, la hidrólisis enzimática llevada a cabo en el Escenario 2 logra aumentar la recuperación global de P (27 $\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ recuperados en el Escenario 2 frente a 19 $\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ recuperados en el Escenario 0).

Sin embargo, esta mayor degradación de la materia orgánica volátil implica una disminución significativa en la producción de biogás, ya que una mayor proporción de la DQO se solubiliza y es arrastrada en el sobrenadante del espesador primario (ver Tabla 69). Por tanto, aunque el Escenario 2 ofrece ventajas claras en términos de recuperación de P y estabilidad operacional, será necesario valorar cuidadosamente el efecto de reintroducir esta corriente, una vez extraído el P-PO₄ mediante cristalización, en la línea de fangos, debido a su alto contenido en materia orgánica fácilmente biodegradable.

En la Tabla 70 se presentan las condiciones operacionales óptimas escogidas para los Escenarios 1 y 3 (Escenario 1+hidrólisis enzimática). Así mismo, se incluyen los resultados de recuperación global de P y caudal volumétrico de biogás obtenidos en estos escenarios. En ambos escenarios se observa que el caudal másico global de P recuperado del sistema es bastante inferior al obtenido en los Escenarios 0 y 2.

Tabla 70. Condiciones operacionales y características de las corrientes de recuperación para los Escenarios 1 y 3.

Intervalos de condiciones óptimas operacionales	Escenario 1	Escenario 3
%Q _{dig}	85	85
%Q _{centr}	15	15
Q _{dig} (m ³ ·d ⁻¹)	81	78
Q _{centr} (m ³ ·d ⁻¹)	14	14
Q Sob. Centr. (m ³ ·d ⁻¹)	4	7
P-PO ₄ Sob. Centr. (mg·L ⁻¹)	88,2	88,6
Q _{Sob. Desh.} (m ³ ·d ⁻¹)	67	64
P-PO ₄ Sob. Desh. (mg·L ⁻¹)	86,0	85,0
P-PO ₄ recup. global (kg·d ⁻¹)	6,0	5,8
Q _{biogás} (m ³ ·d ⁻¹)	1.782	1.725

Como se puede observar en la Tabla 70, el caudal de biogás en el Escenario 3 (promedio 1.753 m³·d⁻¹) es prácticamente igual al del Escenario 0 y del Escenario 1, y claramente superior al del Escenario 2. Aunque en el Escenario 3 se produce una mayor hidrólisis que en el Escenario 1 (debido a la acción de enzimas en la cámara de mezcla), la pérdida de DQO soluble por el sobrenadante de la centrífuga es baja (promedio de 250 kg·d⁻¹), lo que permite mantener una buena producción de biogás. En contraste, en el Escenario 2 se pierde gran parte de la DQO soluble por el sobrenadante del espesador primario (≈1.960 kg·d⁻¹), lo que reduce notablemente la cantidad de biogás generado.

En conclusión, pese a que la configuración de los Escenarios 0 y 2 conlleva el riesgo de desbordamientos en el espesador primario, este puede mantenerse bajo control si se gestionan adecuadamente los parámetros operacionales. A cambio, estos escenarios permiten una recuperación de P significativamente superior a la obtenida en los Escenarios 1 y 3, sin comprometer la estabilidad del manto de fangos.

Por tanto, la configuración planteada en el Escenario 0 (Extracción de P mediante elutriación del fango de la cámara de mezcla en espesador primario) sería la más idónea para que se implementara

en la EDAR de Calahorra. Seguidamente, con el objetivo de maximizar la recuperación de P, se deberían realizar pruebas implementando el Escenario 2. Para ello se mantendría la configuración seleccionada (Escenario 0) y se añadiría una determinada cantidad de enzimas hidrolíticas a la cámara de mezcla.

A partir de los resultados obtenidos tanto en los ensayos enzimáticos (ver apartado 4.1) como en las simulaciones de este apartado, se confirma que es posible mejorar la recuperación de P antes de la digestión anaerobia. Sin embargo, su aplicación requiere un análisis económico detallado para valorar su viabilidad real a escala industrial.

4.3. ANÁLISIS ECONÓMICO

En este apartado se presentan los resultados del estudio de viabilidad económica de los escenarios propuestos en el apartado anterior para maximizar la recuperación de P en la línea de tratamiento de fangos de una EDAR. La evaluación económica se centra en la obtención de estruvita mediante la cristalización del P-PO₄ recuperado en la línea de fangos en los distintos escenarios planteados en el apartado 4.2.2. Para ello, se han analizado los principales costes asociados a la implementación de cada estos escenarios:

- **Convencional:** EDAR DE Calahorra convencional (sin elutriación ni cristalización), como escenario base de partida.
 - **Escenario 0.** Cristalización conjunta del sobrenadante de la deshidratación de fango digerido y del sobrenadante obtenido por elutriación del fango de la cámara de mezcla en el espesador de gravedad.
 - **Escenario 1.** Cristalización conjunta del sobrenadante de la deshidratación de fango digerido y del sobrenadante obtenido mediante el espesado del fango de la cámara de mezcla en centrífuga.
 - **Escenario 2.** Cristalización conjunta del sobrenadante de la deshidratación de fango digerido y del sobrenadante obtenido mediante elutriación del fango de la cámara de mezcla en espesador de gravedad combinado con hidrólisis enzimática.
-

- **Escenario 3.** Cristalización conjunta del sobrenadante de la deshidratación de fango digerido y del sobrenadante obtenido mediante espesado del fango de la cámara de mezcla en centrífuga combinado con hidrólisis enzimática.

El estudio de costes asociados a la recuperación de P en la EDAR de Calahorra se ha centrado en la gestión de la línea de fango teniendo en cuenta los siguientes factores:

- Energía eléctrica asociada a la gestión de la línea de fango en la EDAR (considera los costes de bombeo, agitación y deshidratación a lo largo de la línea de fango)
- Aporte de enzimas hidrolíticas
- Polielectrolito para deshidratación del fango digerido
- Cantidad de fango deshidratado a evacuar de la EDAR
- Energía eléctrica asociada a la operación del cristalizador
- Reactivos para la operación del cristalizador (NaOH y $MgCl_2$)
- Reactor de cristalización
- Biogás producido
- Estruvita producida

A continuación, se presenta la información necesaria para llevar a cabo este estudio. Como se ha comentado en el apartado 3.12, los escenarios sin aporte de enzima (convencional, 0 y 1) fueron probados durante distintos periodos en la EDAR de Calahorra, y los resultados presentados corresponden con los valores medios representativos de dichos periodos. Por lo que respecta a los escenarios con aporte de enzima (2 y 3), la información presentada hace referencia fundamentalmente a los datos obtenidos a partir de simulaciones.

4.3.1. EVALUACIÓN DE CONSUMOS Y PRODUCCIONES DE LOS DISTINTOS ESCENARIOS PARA LA RECUPERACIÓN DE P

La Tabla 71 presenta los principales parámetros operativos correspondientes a los distintos escenarios evaluados en la EDAR de Calahorra (Escenario 0 y Escenario 1), así como del escenario base (Convencional) que se ha utilizado como referencia para la comparación.

La calidad del agua afluente a la EDAR presenta ciertas variaciones para los distintos escenarios evaluados. Entre ellas, las más determinantes desde el punto de vista operativo y de evaluación del rendimiento del sistema son el caudal y la carga de P afluente, parámetros que deben ser considerados en el análisis comparativo de los distintos escenarios del proceso. Para los escenarios 2 y 3 no existen tales diferencias ya que se han estudiado por simulación fijando las mismas características del agua de entrada. Otro factor importante a tener en cuenta es el rendimiento de eliminación de P en la EDAR. A mayor eliminación, más cantidad de P pasa a la línea de fango y, por tanto, el potencial de recuperación de P es mayor. Como se puede observar en la Tabla 71, la eliminación de P es de un 80%, excepto para el Escenario 1 donde éste se eleva hasta el 93%.

Respecto al sistema de extracción de P, los caudales de elutriación (Q_{elut}) y sobrenadantes ($Q_{\text{sob. Esp. 1º}}$, $Q_{\text{sob. Centr}}$ y $Q_{\text{sob. Desh}}$) obtenidos durante la operación del sistema guardan bastante similitud con los valores obtenidos por simulación (ver apartado 4.2.2.1), tanto para el Escenario 0 como para el Escenario 1. En cambio, en lo que respecta a las concentraciones de P- PO_4 obtenidas existen mayores discrepancias, observándose una menor concentración en el sobrenadante del espesador primario (Escenario 0) y mayores concentraciones en los sobrenadantes de deshidratación (Escenario 0) y de la centrífuga (Escenario 1). Las simulaciones de los Escenarios 2 y 3 mostraron que la cantidad de enzima requerida, para la dosis seleccionada como óptima ($25\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ fango (b.h.)), era muy elevada, dados los altos caudales máscicos de fango que se llevan a la cámara de mezcla, especialmente en el Escenario 3. Estas cantidades de enzima se han calculado haciendo uso de los caudales de fango (b.h.) de entrada a la cámara de mezcla a tratar en cada caso:

- a) En el Escenario 2 este caudal incorpora fango secundario y parte de fango elutriado junto con fango primario desde el espesador. A su vez, este caudal se calcula a partir del caudal másico de SST de entrada a la cámara de mezcla.
- b) En el Escenario 3 este caudal incorpora el caudal de elutriación desde la centrífuga además del fango primario y secundario. A su vez, este caudal se calcula a partir del caudal másico de SST de entrada a la cámara de mezcla.

Respecto al consumo energético del sistema de extracción de P, que considera la energía eléctrica asociada a la gestión de la línea de fango, puede observarse que la implementación del sistema de extracción en la EDAR no supone un incremento excesivo, observándose el máximo incremento, respecto a la operación convencional, para el Escenario 1 (5,4%).

En la Tabla 71 también se observa como la implementación de un sistema de recuperación de P supone una reducción del contenido de P perdido en los fangos evacuados de la EDAR, aun teniendo en cuenta las diferencias de P afluente existentes debido al hecho de trabajar con datos operacionales reales de operación para los escenarios Convencional, 0 y 1 y con datos simulados en el caso de Escenarios 2 y 3.

Tabla 71. Datos característicos de la operación de los distintos escenarios evaluados.

	Escenario					
Parámetro	Convencional	0	1	2	3	Unidades
Afluente EDAR						
Caudal	13310	16334	15420	14373	14373	m ³ ·d ⁻¹
SST	269	197	155	320	320	mg SST·L ⁻¹
DQO _T	684	534	466	668	668	mg DQO·L ⁻¹
DBO ₅	294	300	249	421	421	mg DBO·L ⁻¹
P _T	7,0	6,2	5,3	5,3	5,3	mg P·L ⁻¹
P-PO ₄	4,5	4,3	3,7	2,4	2,4	mg P·L ⁻¹
N _T	51,5	45,0	45,7	40,1	40,1	mg N·L ⁻¹
N-NH ₄	32,8	27,0	31,3	31,2	31,2	mg N·L ⁻¹
Carga P _T	93,2	101,3	81,7	75,9	75,9	kg P·d ⁻¹
Efluente EDAR						
Caudal	13281	15760	14916	13876	13876	m ³ ·d ⁻¹
SST	8	5	8	8	8	mg SST·L ⁻¹
DQO _T	34	25	26	24	24	mg DQO·L ⁻¹

Parámetro	Escenario					Unidades
	Convencional	0	1	2	3	
DBO ₅	3	14	9	8	8	mg DBO·L ⁻¹
P _T	1,4	1,2	0,4	1,1	1,1	mg P·L ⁻¹
P-PO ₄	0,7	1,0	0,3	0,8	0,8	mg P·L ⁻¹
N _T	9,8	12,0	8,1	5,8	5,8	mg N·L ⁻¹
N-NH ₄	3,2	5,0	1,2	0,1	0,1	mg N·L ⁻¹
Eliminación P _T	80,0	80,6	92,8	79,2	79,2	%
Sistema de extracción de P						
Q _{elut} CM-Esp 1º	---	84	---	36	---	m ³ ·d ⁻¹
Q _{elut} CM-HUBER	---	---	9,0	---	13,8	m ³ ·d ⁻¹
Q _{sob.} Esp. 1º	---	60	---	151	---	m ³ ·d ⁻¹
P-PO ₄ Sob. Esp. 1º	---	78,6	---	167	---	mg P·L ⁻¹
Q _{sob.} HUBER	---	---	4,1	---	6,5	m ³ ·d ⁻¹
P-PO ₄ Sob. HUBER	---	---	104	---	117	mg P·L ⁻¹
Q _{sob.} Desh	79,8	129	66,4	44,0	64,0	m ³ ·d ⁻¹
P-PO ₄ Sob. Desh.	84,6	85,7	83,8	38,0	79,0	mg P·L ⁻¹
Fango afluente _{CM}				1803	4135	kg SST·d ⁻¹
Consumo enzima	---	---	---	911	2299	kg·d ⁻¹
Energía requerida	727,88	735,58	767,20	726,10	756,61	kWh·d ⁻¹
Producción de fango y biogás						
Fango generado	2344	2224	2186	2139	2264	kg SST·d ⁻¹
P en fango	58,4	29,1	31,0	25,9	31,9	kg P·d ⁻¹
Biogás generado	1607	1539	1369	934	1529	Nm ³ ·d ⁻¹
Consumo poli	19,9	18,6	18,3	17,9	19,9	kg·d ⁻¹

En la Tabla 72 se presentan las características de la corriente resultante a alimentar al cristalizador para cada uno de los escenarios de recuperación de P planteados y las producciones de estruvita alcanzadas en cada uno de estos. **Para los Escenarios 0 y 1**, el cálculo de la producción de estruvita se ha basado en los rendimientos operativos reales del cristalizador obtenidos durante su funcionamiento en dichos escenarios. Cabe señalar que estos rendimientos proceden de estudios experimentales realizados fuera del alcance de esta tesis y cuyos resultados no han sido publicados aún. En cuanto a los caudales, para los Escenarios 0 y 1 se han empleado los valores reales de sobrenadantes generados en la EDAR de Calahorra (ver en Tabla 72). Cabe mencionar que el cristalizador instalado en la EDAR de Calahorra tiene una capacidad máxima de tratamiento de 20 m³·d⁻¹, por lo que experimentalmente sólo se alimentó una fracción del caudal total de sobrenadantes generados. Dado que la composición alimentada al cristalizador piloto es representativa del total de caudal generado, los resultados de producción de estruvita son

perfectamente extrapolables, y de ese modo se ha calculado la producción máxima de estruvita baja cada escenario.

Tabla 72. Datos característicos del proceso de cristalización.

	Escenario					
Parámetro	Convencional	0	1	2	3	Unidades
Afluente Cristalizador						
Caudal	---	189	70,5	195	70,5	m ³ ·d ⁻¹
SST	---	665	277	686	350	mg SST·L ⁻¹
P _T	---	100,4	127,7	151,3	127,7	mg P·L ⁻¹
P-PO ₄	---	83,4	85,0	137,9	82,5	mg P·L ⁻¹
N-NH ₄	---	84,8	66,5	358,1	730,4	mg N·L ⁻¹
Ca/P	---	0,78	0,71	0,60	0,75	mol·mol ⁻¹
N/P	---	7,31	18,77	5,74	19,56	mol·mol ⁻¹
Mg/P	---	0,36	0,22	0,30	0,24	mol·mol ⁻¹
Datos operación cristalizador						
Estruvita formada	---	92,6	34,5	120,9	34,6	kg·d ⁻¹
P recuperado	---	11,7	4,4	15,3	4,4	kg P·d ⁻¹
NaOH requerido	---	76,2	28,4	99,5	28,5	kg·d ⁻¹
MgCl ₂ requerido	---	95,6	35,7	124,8	35,7	kg·d ⁻¹
Energía requerida	---	280,0	104,4	288,9	104,5	kWh·d ⁻¹
Vol. cristalizador	---	48,4	18,0	49,9	18,1	m ³

Por otro lado, **para los Escenarios 2 y 3**, que no han sido implementados a escala real, no se dispone de datos experimentales de operación del cristalizador. Esto se debe a que, dado el elevado coste de la enzima hidrolítica y con el objetivo de averiguar su viabilidad económica, se optó por realizar previamente un estudio económico basado en los datos experimentales obtenidos en los Escenarios 0 y 1. Los resultados de este análisis mostraron que, bajo las condiciones y precios vigentes en 2022, la inclusión de la enzima implicaría unas pérdidas económicas significativas. Por este motivo, **no se procedió a validar experimentalmente los Escenarios 2 y 3 en la EDAR de Calahorra.**

En consecuencia, los caudales mostrados en la Tabla 72 para los Escenario 2 y 3 corresponden a los valores generados mediante simulaciones. A partir de estas simulaciones y tomando como referencia los rendimientos observados en los Escenarios 0 y 1, se han estimado las posibles producciones de estruvita para los Escenarios 2 y 3. Para ello se han considerado las características de los sobrenadantes generados (concentraciones de SST y P-PO₄, así como las relaciones molares Ca/P, N/P y Mg/P) simuladas para estos escenarios.

La elutriación en espesador (Escenarios 0 y 2) son las que generan mayores caudales de sobrenadantes a tratar con concentraciones también elevadas, especialmente en el Escenario 2 debido al efecto hidrolítico de las enzimas aportadas. Esto lleva a que se obtengan las mayores producciones de estruvita para estos dos escenarios, pero que también se requiera para ellas un mayor volumen de cristalizador, lo que deberá tenerse en cuenta el estudio económico. La energía requerida para llevar a cabo la cristalización también es mayor para estos dos escenarios debido al mayor consumo en agitación del cristalizador y en bombeo de sobrenadantes y reactivos.

A partir de los datos operacionales recogidos en la Tabla 71 y en la Tabla 72 se han calculado, en primer lugar, los consumos y producciones, asociados a cada parámetro, normalizados por m³ de agua afluente a la EDAR (Tabla 73). Para el cálculo de estos consumos y producciones se ha hecho uso de los ratios de operación de la planta piloto de cristalización de la EDAR de Calahorra (Tabla 15, apartado 3.12).

Así mismo para la estimación de los consumos energéticos, se consideraron los requisitos energéticos asociados a la operación de cristalización de estruvita en todos los escenarios, salvo en el escenario convencional, en el que dicha operación no está contemplada. En lo que respecta a la línea de fangos, se incluyeron los consumos energéticos vinculados a las operaciones de espesamiento, elutriación y deshidratación, considerando los equipos implicados: bombeos, sistemas de aireación, agitación y equipos de deshidratación.

Tabla 73. Consumos y producciones por m³ de agua tratada.

	Escenario					
Parámetro	Convencional	0	1	2	3	Unidades
Consumo energía eléctrica						
Línea de fango	0,0506	0,0512	0,0534	0,0505	0,0526	kWh·m ⁻³
Cristalizador	---	0,0171	0,0068	0,0201	0,0073	kWh·m ⁻³
Consumo de reactivos						
Polielectrolito	0,0015	0,0011	0,0012	0,0012	0,0013	kg·m ⁻³
Enzimas	---	---	---	0,0634	0,1599	kg·m ⁻³
NaOH	---	0,0047	0,0018	0,0069	0,0020	kg·m ⁻³
MgCl ₂	---	0,0059	0,0023	0,0087	0,0025	kg·m ⁻³
Producciones						
Fango	1,1008	0,8510	0,8860	0,9302	0,9845	kg·m ⁻³
Energía Biogás	0,2640	0,2493	0,2116	0,1552	0,2523	kWh·m ⁻³
Estruvita	---	0,0057	0,0022	0,0084	0,0024	kg·m ⁻³

Los valores de consumo energético empleados proceden tanto de datos reales de planta como de los resultados obtenidos mediante simulaciones. Cabe destacar que únicamente se ha considerado el consumo energético de la línea de fangos, ya que la línea de agua permanece constante en todos los escenarios evaluados.

Respecto al consumo en energía eléctrica, en la Tabla 73 se puede observar como la implementación de un sistema de recuperación de P (elutriación) genera un incremento del consumo eléctrico asociado a la línea de fango, respecto al sistema convencional, en todos los escenarios excepto en el Escenario 2, donde el consumo es ligeramente menor. Este incremento se debe fundamentalmente al consumo de energía en bombeo, especialmente para el Escenario 0, y al incremento en el consumo asociado a la centrífuga empleada en la elutriación en los Escenarios 1 y 3. Los incrementos de consumo eléctrico respecto al sistema convencional son de en torno al 1, 5 y 4% para los Escenarios 0, 1 y 3, respectivamente. El proceso de cristalización implica un aumento del consumo eléctrico en torno a 0,0070 kWh·m⁻³ para los Escenarios 1 y 3, y alrededor de 0,019 kWh·m⁻³ para los Escenarios 0 y 2. El mayor incremento en estos dos últimos escenarios está asociado al mayor caudal de sobrenadante a cristalizar generado.

La implementación de sistemas de extracción de P en la EDAR de Calahorra genera un descenso en la producción de fango deshidratado a evacuar en la instalación entre el 10 y el 20% respecto al escenario convencional, lo que también lleva asociado un descenso en el consumo de polielectrolito necesario para la deshidratación del fango y en la producción de biogás. Este descenso en la producción de biogás, y por tanto en la energía recuperada de éste, se debe en parte a que los procesos de elutriación fomentan etapas de hidrólisis/solubilización de sustratos orgánicos, siendo los productos orgánicos solubles resultantes elutriados y llevados a la etapa de cristalización con el sobrenadante del espesador primario (Escenarios 0 y 2) o de la centrífuga (Escenarios 1 y 3) por lo que no se introducen en la digestión anaerobia. Estos sustratos orgánicos tras la etapa de cristalización retornan a la línea de agua, donde son degradados mayoritariamente sin generar biogás. Este efecto de hidrólisis/solubilización es mucho más notable en los Escenarios 2 y 3 debido al aporte de enzimas, que potencia este proceso de hidrólisis. Además, en el Escenario 2, el mayor caudal de elutriación respecto al Escenario 3, hace que el descenso en la energía aportada por el biogás se situó alrededor del 40%. Respecto a los Escenarios 0 y 1, el descenso en la energía aportada por el biogás, respecto al escenario convencional es del 6 y 20%, respectivamente. Este mayor descenso para el Escenario 1 está también influenciado por la menor carga de materia orgánica afluente a la EDAR durante el periodo de estudio de este escenario, y no sólo por los procesos de elutriación llevados a cabo.

Dado que el objetivo de la presente tesis es la recuperación de P, a partir de los datos operacionales recogidos en la Tabla 71 y en la Tabla 72 también se han calculado los consumos y producciones, asociados a cada parámetro, normalizados por kg P (Tabla 74) afluente a la EDAR. Con estos valores normalizados también se lleva a cabo a continuación un análisis comparativo de consumos y producciones entre los cuatro escenarios contemplados para la recuperación de P.

Tabla 74. Consumos y producciones por kg de P afluente.

	Escenario					
Parámetro	Convencional	0	1	2	3	Unidades
Consumo energía eléctrica						
Línea de fango	7,24	8,26	10,07	9,57	9,97	kWh·kg ⁻¹ P
Cristalizador	---	2,77	1,28	3,81	1,38	kWh·kg ⁻¹ P
Consumo de reactivos						
Polielectrolito	0,213	0,184	0,224	0,236	0,253	kg·kg ⁻¹ P
Enzimas	---	---	---	12,0	30,3	kg·kg ⁻¹ P
NaOH	---	0,753	0,348	1,312	0,375	kg·kg ⁻¹ P
MgCl ₂	---	0,944	0,436	1,644	0,470	kg·kg ⁻¹ P
Producciones						
Fango	157,3	137,3	167,2	176,2	186,5	kg·kg ⁻¹ P
Energía Biogás	37,7	40,2	39,9	29,4	47,8	kWh·kg ⁻¹ P
Estruvita	---	0,914	0,423	1,593	0,455	kg·kg ⁻¹ P

Como se observa en la Tabla 74, el menor consumo de energía eléctrica asociado a la línea de fango, por kg de P afluente, se produce en el Escenario 0 (8,26 kWh·kg⁻¹ P), siendo dicho consumo entre un 16-22% inferior en el resto de los escenarios. El escenario más eficiente en la recuperación del P afluente es el Escenario 2 (con 1,6 kg de estruvita·kg⁻¹ P afluente) seguido del Escenario 0 (0,9 kg de estruvita·kg⁻¹ P afluente), ambas con elutriación en espesador de gravedad. No obstante, el consumo energético asociado a la cristalización en el Escenario 2 es un 38% superior al del Escenario 0, debido, tal y como se ha comentado anteriormente, a los mayores consumos en bombeo y agitación del cristalizador.

4.3.2. ANÁLISIS ECONÓMICO DE LOS DISTINTOS ESCENARIOS PARA LA RECUPERACIÓN DE P

A partir de los consumos y producciones obtenidos para cada uno de los escenarios evaluados se ha procedido a calcular los costes asociados. Para ello se han utilizado los precios unitarios que se recogidos en la Tabla 15 (ver apartado 3.12).

El coste unitario de la energía eléctrica se ha fijado tomando como referencia las tarifas vigentes durante el año 2022 para la tarifa industrial 6.1 TD, en coherencia con el periodo de realización del estudio económico, tal y como se ha indicado en el apartado 3.12. Cabe señalar que, en la actualidad, dichas tarifas han experimentado una disminución, por lo que los valores considerados podrían estar

sobreestimados respecto a la situación actual lo cual, en todo caso, favorecería la viabilidad económica de la implantación de estos escenarios en la EDAR. En cuanto a la energía térmica aportada por el biogás generado en la EDAR, se ha asumido un coste equivalente al de la energía eléctrica comprada (precio de 2022). Esta decisión se basa en que no se contempla en el análisis la cogeneración ni la venta externa de energía, sino su aprovechamiento íntegro para autoconsumo dentro de la propia instalación. En el cálculo de la energía útil procedente del biogás ya se ha descontado tanto la energía requerida para el calentamiento de los fangos antes de su entrada al digestor anaerobio como las pérdidas térmicas asociadas al proceso digestivo.

A partir de estos costes unitarios (Tabla 15, apartado 3.12) y de los datos recogidos en la Tabla 72, Tabla 73 y Tabla 74 se han calculado los costes/beneficios asociados a los parámetros anteriormente citados, normalizados por m^3 (Tabla 75) y kg P (Tabla 76) afluente a la EDAR.

Tabla 75. Costes por m^3 de agua tratada.

	Escenario					
Parámetro	Convencional	0	1	2	3	Unidades
Energía eléctrica						
Línea de fango	0,0145	0,0146	0,0152	0,0144	0,0150	€·m ⁻³
Cristalizador	---	0,0049	0,0019	0,0057	0,0021	€·m ⁻³
Reactivos						
Polielectrolito	0,0035	0,0027	0,0028	0,0029	0,0031	€·m ⁻³
Enzimas	---	---	---	0,0634	0,1599	€·m ⁻³
NaOH	---	0,0029	0,0011	0,0043	0,0012	€·m ⁻³
MgCl ₂	---	0,0022	0,0009	0,0032	0,0009	€·m ⁻³
Cristalizador						
Inversión	---	869294	335629	896315	335764	€
Producciones						
Fango	0,0154	0,0119	0,0124	0,0130	0,0138	€·m ⁻³
Energía Biogás	0,0754	0,0712	0,0604	0,0443	0,0720	€·m ⁻³
Estruvita	---	0,0014	0,00055	0,0021	0,00059	€·m ⁻³

Tabla 76. Costes y beneficios por kg de P afluyente.

	Escenario					
Parámetro	Convencional	0	1	2	3	Unidades
Energía eléctrica						
Línea de fango	2,065	2,357	2,875	2,732	2,846	€·kg ⁻¹ P
Cristalizador	---	0,789	0,365	1,087	0,393	€·kg ⁻¹ P
Reactivos						
Polielectrolito	0,499	0,431	0,525	0,553	0,592	€·kg ⁻¹ P
Enzimas	---	---	---	12,01	30,29	€·kg ⁻¹ P
NaOH	---	0,467	0,216	0,813	0,232	€·kg ⁻¹ P
MgCl ₂	---	0,349	0,161	0,608	0,174	€·kg ⁻¹ P
Producciones						
Fango	2,20	1,922	2,340	2,466	2,610	€·kg ⁻¹ P
Energía Biogás	10,77	11,48	11,40	8,39	13,64	€·kg ⁻¹ P
Estruvita	---	0,224	0,104	0,390	0,112	€·kg ⁻¹ P

En la Tabla 77 se presenta el beneficio neto de cada escenario, así como el período de retorno de la inversión realizada en la implementación del cristalizador. Así mismo, también se incluyen los costes e ingresos obtenidos para el escenario convencional donde no se realiza ningún tipo de recuperación del P.

Tabla 77. Análisis económico por m³ de agua tratada y por kg de P afluyente.

Parámetro	Escenario					Unidades
	Convencional	0	1	2	3	
Costes	0,033	0,039	0,034	0,107	0,196	€·m ⁻³
Ingresos	0,075	0,073	0,061	0,046	0,073	€·m ⁻³
Beneficio	0,042	0,033	0,027	-0,061	-0,123	€·m ⁻³
Costes	4,77	6,31	6,48	20,27	37,14	€·kg ⁻¹ P
Ingresos	10,77	11,70	11,50	8,78	13,75	€·kg ⁻¹ P
Beneficio	6,00	5,39	5,02	-11,48	-23,39	€·kg ⁻¹ P
Período de retorno	---	4,36	2,24	---	---	años

En el cómputo de los costes se ha considerado la energía eléctrica para la operación de la línea de fango y el cristalizador, los costes de reactivos (NaOH, MgCl_2 , polielectrolito, enzima) y el coste de gestión del fango generado. Como ingresos se ha considerado la energía aportada por el biogás y la venta directa de la estruvita producida como fertilizante, al precio de mercado actual.

Como se puede observar en la Tabla 77, no todos los escenarios evaluados generan beneficios económicos. Los escenarios 0 y 1, que no incluyen el aporte de enzima hidrolítica, presentan resultados económicos favorables. El Escenario 0 muestra un beneficio de $0,033 \text{ €}\cdot\text{m}^{-3}$ de agua tratada o $5,39 \text{ €}\cdot\text{kg}^{-1}$ de P afluente, mientras que el Escenario 1 ofrece un beneficio algo inferior, de $0,027 \text{ €}\cdot\text{m}^{-3}$ de agua tratada o $5,02 \text{ €}\cdot\text{kg}^{-1}$ de P afluente. Ambos resultan económicamente viables, siendo además los únicos con periodos de retorno razonables: 4,36 y 2,24 años, respectivamente.

Por el contrario, los Escenarios 2 y 3, que incluyen el aporte de enzimas, presentan pérdidas económicas significativas. En el caso del Escenario 2, se obtiene una pérdida de $-0,061 \text{ €}\cdot\text{m}^{-3}$ de agua tratada o $-11,48 \text{ €}\cdot\text{kg}^{-1}$ de P afluente, mientras que en el Escenario 3 el resultado es aún más negativo, alcanzando $-0,123 \text{ €}\cdot\text{m}^{-3}$ de agua tratada o $-23,99 \text{ €}\cdot\text{kg}^{-1}$ de P afluente. Estas cifras reflejan que, aunque el uso de enzimas incrementa la producción de estruvita, el elevado coste del producto en su forma actual de dosificación impide que la aplicación sea rentable.

En cuanto a la comparación con el escenario convencional, este presenta un beneficio superior ($0,042 \text{ €}\cdot\text{m}^{-3}$ de agua tratada o $6,00 \text{ €}\cdot\text{kg}^{-1}$ P) al de los Escenarios 0 y 1, aunque las diferencias no son excesivas. No obstante, podrían considerarse alternativas viables si se prioriza la recuperación de P sin incurrir en costes adicionales significativos. En cambio, los Escenarios con enzima (2 y 3) resultan claramente no viables bajo los parámetros económicos actuales. El coste tan elevado de la enzima merma notablemente su empleo en el proceso, aunque aumente la producción de estruvita. Por tanto, con el precio actual de la enzima y la forma de dosificación empleada, su aplicación al proceso no es viable y, por este motivo, no se realizó el estudio experimental de los Escenarios 2 y 3 en la EDAR de Calahorra, tal y como se ha comentado al inicio del presente apartado.

Respecto a los escenarios donde no se ha considerado el aporte de enzima (Escenarios 0 y 1), la reducción del beneficio respecto al escenario convencional es menor para el Escenario 0 (un 21% menor realizando el análisis por m³ de agua tratada o un 10% menor por kg P afluente a la EDAR). Las necesidades de energía eléctrica (asociadas al consumo de los nuevos equipos instalados y a la reducción en la energía obtenida del biogás) es el factor con más influencia en el descenso del beneficio obtenido, y más en el contexto de los precios de la energía actuales. El precio de venta fijado para la estruvita en la EDAR, junto con los mínimos ahorros en gestión de fango y polielectrolito no compensa el incremento de coste energético ni el consumo de los reactivos respecto a una operación convencional. Para que la recuperación de estruvita no implicara una reducción de beneficios respecto al escenario convencional (no recuperar P), el precio venta de la estruvita debería situarse en torno a los 1600 €·Tn⁻¹.

Por tanto, para valorar la rentabilidad de instalar un proceso de recuperación de P sería necesario incorporar otros factores de análisis como el beneficio de minimizar el impacto sobre la extracción de recursos naturales para generar fertilizantes o la reducción del impacto de aplicar sobre el terreno fangos con un menor contenido en P que prevengan de posibles problemas de eutrofización. Así mismo, la estruvita producida podría mejorar su valor en el mercado generando un fertilizante base estruvita con mejores propiedades agronómicas.

Asumiendo esta reducción sobre el beneficio en la gestión convencional de la EDAR, el Escenario 0 presenta mejores resultados que el Escenario 1 (beneficios superiores en un 20% por m³ de agua tratada o en un 7% por kg P afluente a la EDAR). Analizando el período de retorno de la inversión realizada en el cristalizador, éste se sitúa en 4,36 y 2,24 años para los Escenarios 0 y 1, respectivamente, por lo que la inversión puede considerarse viable. En 10,8 años, los beneficios acumulados generados por el Escenario 0 superarían a los generados por el Escenario 1, asumiendo los caudales y características del agua a tratar y los costes unitarios fijados. No obstante, para llevar un estudio económico más ajustado, éste debería realizarse para el escenario más adecuado empleando datos experimentales obtenidos durante periodos de operación prolongados en el tiempo (2-3 años) para poder así evaluar todos los efectos a nivel global teniendo en cuenta las

variaciones estacionales en las características del agua tratada que afectan a los rendimientos de depuración de la EDAR.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Del estudio a escala de laboratorio sobre la aplicabilidad de enzimas hidrolíticas en fangos de EDAR para promover la liberación de P orgánico se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los métodos utilizados para la determinación del ácido fítico en la matriz de fango de EDAR evidencian importantes limitaciones analíticas, derivadas de la elevada complejidad de esta matriz y de la escasa sensibilidad y reproducibilidad de las metodologías utilizadas. El método colorimétrico resultó insuficiente para detectar con fiabilidad el compuesto, mientras que la técnica HPLC-MS mostró una mayor capacidad de detección, aunque con una alta variabilidad influenciada por el protocolo de pretratamiento aplicado.
 2. Los ensayos enzimáticos realizados con enzimas fitasa sobre fango secundario (lote "S") mostraron que el aumento de la temperatura del proceso de 23°C a 35°C potencia la actividad hidrolítica de la enzima, favoreciendo la liberación de P-PO₄. Asimismo, la extensión del tiempo de reacción de 8 a 22 h resultó en una mayor liberación de P, indicando que el tiempo de contacto entre enzima y sustrato es un factor clave para optimizar el proceso. Para estos ensayos, con los parámetros operacionales finalmente seleccionados (22 h y 35°C), las mayores liberaciones netas de P-PO₄ y los porcentajes más altos de eficacia se alcanzaron con una dosis de 25 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h), sin observarse mejoras al aumentar la dosis.
 3. Los ensayos enzimáticos realizados con enzimas fitasa sobre fango mezcla (lote "M"), realizados bajo las condiciones operativas seleccionadas (22 h y 35°C), confirmaron que la dosis óptima se sitúa alrededor de 25 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h.). Dosis superiores no aportan beneficios adicionales, ya que el sistema comienza a saturarse, mientras que dosis inferiores no alcanzan una hidrólisis efectiva.
 4. Con la dosis de enzima determinada como óptima, se observaron los siguientes resultados: en el fango secundario se alcanzaron liberaciones netas de P-PO₄ de 31,2 mg P·L⁻¹ y 47,0 mg P·L⁻¹, con eficacias de 31,6% y 40,9%, respectivamente. En el caso
-

del fango mezcla, las liberaciones netas se situaron entre 41 mgP·L⁻¹ y 62 mgP·L⁻¹, con porcentajes de eficacia menores al 10%.

5. Aunque el fango secundario presenta mayores porcentajes de eficacia, el fango mezcla libera mayores concentraciones de P-PO₄ debido a su mayor contenido inicial de P orgánico. Esto permite optimizar el proceso debido a la menor ratio enzima/sustrato requerida. Además, el uso de la enzima en el fango mezcla potencia la actividad de las bacterias acidogénicas presentes en este fango, contribuyendo a una mayor solubilización de compuestos orgánicos y reforzando los procesos de hidrólisis.
 6. Los ensayos enzimáticos realizados con enzimas celulolíticas sobre fango mezcla (lote “C”) mostraron que se necesita una dosis mayor (50 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h.)) para obtener liberaciones netas de P-PO₄ similares a las obtenidas con las enzimas fitasas a menor dosis (25 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h.)). A esta dosis mayor, se obtuvieron liberaciones netas de P-PO₄ entre 33,3 mg P·L⁻¹ y 41,9 mg P·L⁻¹, con un porcentaje de eficacia asociado menor también al 10%, como en el caso del lote “M”. En contraste, la dosis de 25 g enzima·kg⁻¹ fango (b.h.) mostró un efecto hidrolítico prácticamente inexistente.
 7. El estudio del potencial de biometanización, realizado para evaluar la biodegradabilidad anaerobia de las enzimas utilizadas y su posible contribución a la producción de biogás, indicó que la introducción de la enzima no genera una mejora en la biodegradabilidad anaerobia del fango mezcla y, por tanto, en la producción de metano a partir de este sustrato.
 8. En los ensayos de inmovilización enzimática, se comprobó que tanto la elección del crosslinker como las condiciones de encapsulación son factores clave para el rendimiento del sistema. Una estrategia de encapsulación óptima debe lograr un equilibrio entre la estabilidad física del material, la compatibilidad con el entorno ácido del fango y un control adecuado de la liberación enzimática. En este contexto, los ensayos realizados con enzimas fitasas inmovilizadas y fango mezcla como sustrato (lote “I”) demostraron que las
-

formulaciones obtenidas mediante el método sol-gel con secado natural (Pastillas #1 y #2) fueron las más robustas y efectivas.

9. Las Pastillas #1 y #2 destacaron tanto por su capacidad de liberar $P-PO_4$ de forma sostenida como por su estabilidad en ciclos sucesivos, alcanzando hasta tres ciclos de operación con liberaciones netas de $P-PO_4$ entre $53 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$ y $80 \text{ mg } P \cdot L^{-1}$ y eficacias del proceso entre 12,2 % y 19,6 %. Estos valores fueron comparables, e incluso superiores en algunos casos, a los obtenidos con la enzima en forma libre en cada ciclo. En consecuencia, el uso de enzimas encapsuladas permitiría una reducción del 66,7 % en el consumo de enzima, sin comprometer la eficacia del proceso.

Del estudio de simulaciones de alternativas de operación orientadas a maximizar la recuperación de P antes de la digestión anaerobia se extraen las siguientes conclusiones:

10. Los escenarios simulados sin hidrólisis enzimática muestran diferencias significativas en la recuperación de P: el Escenario 0 (elutriación en espesador de gravedad) alcanza $19,3 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$ de P, pero presenta un riesgo operativo importante debido a posibles desbordamientos en el espesador primario si no se controlan adecuadamente las variables operativas. El Escenario 1 (elutriación en centrífuga), aunque con menor recuperación ($6 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$), ofrece una configuración más estable. Ambos generan corrientes adecuadas para la cristalización de estruvita, atendiendo a las relaciones molares Ca/P, N/P y Mg/P. En cuanto a la relación Ca/P, se observaron valores entre 0,71 y 0,78, lo que podría favorecer la formación de fosfatos cálcicos. La relación N/P, entre 7,3 y 18,8, garantiza una buena disponibilidad de $N-NH_4$ para la cristalización. Por su parte, la relación Mg/P, con valores entre 0,22 y 0,36 indica la necesidad de añadir magnesio para optimizar la cristalización y maximizar la recuperación de P como estruvita.
 11. Los escenarios simulados con hidrólisis enzimática muestran diferencias claras en cuanto a la recuperación de P y la producción de biogás. El Escenario 2 destaca por su mayor recuperación total de P, alcanzando un valor de $27,0 \text{ kg} \cdot \text{d}^{-1}$ y una concentración elevada
-

de P-PO_4 ($138,13 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$) en la corriente destinada a la cristalización, aunque requiere de un control operativo para evitar desbordamientos en el espesador primario. En cambio, el Escenario 3 presenta una recuperación de P menor ($5,8 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$) pero genera una producción de biogás 1,6 veces mayor debido a que no se produce una pérdida significativa de DQO soluble en la corriente sobrenadante de la centrífuga. Esta mayor producción de biogás en el Escenario 3 puede suponer ventajas energéticas y económicas. Por lo tanto, la elección entre ambos escenarios debe considerar si el mayor rendimiento en P del Escenario 2 justifica su menor producción de biogás frente al Escenario 3.

Del estudio económico sobre la implementación de las configuraciones planteadas para maximizar la recuperación de P en la EDAR de Calahorra se puede concluir que:

12. La implementación en la EDAR de Calahorra de sistemas de extracción de P genera un descenso en la producción de fango entre el 10 y el 20% respecto al escenario convencional, lo que también supone un descenso en el consumo de polielectrolito y en la producción de biogás.
 13. Entre los cuatro escenarios contemplados para la recuperación de P, el menor consumo de energía eléctrica asociado a la línea de fango, por kg de P afluente, se produce en el Escenario 0 ($8,26 \text{ kWh}\cdot\text{kgP}^{-1}$), siendo dicho consumo entre un 16-22% superior en el resto de los escenarios. El escenario más eficiente en la recuperación del P afluente es el Escenario 2 (con $1,6 \text{ kg}$ de estruvita $\cdot\text{kg}^{-1}$ P afluente) seguido del Escenario 0 ($0,9 \text{ kg}\cdot\text{kgP}^{-1}$), ambas con elutriación en espesador de gravedad. No obstante, el consumo energético asociado a la cristalización en el Escenario 2 ($3,81 \text{ kWh}\cdot\text{kg}^{-1}$ P) es un 38% superior al del Escenario 0 ($2,77 \text{ kWh}\cdot\text{kg}^{-1}$ P), debido a los mayores consumos en bombeo y agitación del cristizador.
 14. El coste tan elevado de la enzima hace inviable su aplicación en las condiciones estudiadas, por lo que, aunque aumente la producción de estruvita, quedan descartados los Escenarios 2 y 3. No obstante, cabe señalar que la enzima también puede valorizarse
-

energéticamente, ya que su dosificación aporta DQO adicional que, como se demostró en los ensayos de biometanización, aumenta la producción de biogás.

15. En caso de implementar un sistema de recuperación de P en la EDAR de Calahorra, el Escenario 0 presenta los mejores resultados económicos entre las configuraciones con recuperación de P (beneficios superiores en un 20% por m³ de agua tratada o en un 7% por kg P afluente a la EDAR respecto al Escenario 1). Analizando el período de retorno de la inversión realizada, éste se sitúa en 4,36 y 2,24 años para los Escenarios 0 y 1, respectivamente, por lo que la inversión puede considerarse viable.
 16. En base a los resultados obtenidos, la implementación de sistemas de recuperación de P en la EDAR de Calahorra supondría un aumento de los costes operativos respecto a la situación actual, ya que estos no se compensan ni con los ingresos por la venta de estruvita ni con ahorros operativos. Para que la recuperación fuera rentable, el precio de la estruvita debería alcanzar unos 1.600 €·t⁻¹, valor muy por encima del precio de mercado actual. No obstante, la evaluación de la implementación de tecnologías de recuperación no debe ceñirse única y exclusivamente a aspectos económicos tangibles. La viabilidad de estas tecnologías debe contemplarse también desde una perspectiva ambiental y social, considerando los beneficios asociados a la sostenibilidad y la reducción del impacto ambiental derivado de la disminución en el uso de fertilizantes minerales convencionales.
-

PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se identifican diversas líneas de actuación y mejora que podrían potenciar la viabilidad técnica, económica y ambiental de los procesos de recuperación de P en EDAR, mediante el uso de enzimas hidrolíticas y su posterior precipitación en forma de estruvita. Estas perspectivas futuras se alinean con los objetivos de la economía circular, la sostenibilidad de los sistemas de tratamiento de aguas y la valorización de residuos.

En primer lugar, se hace patente la necesidad de contar con un método analítico fiable y validado para la cuantificación precisa de ácido fítico en matrices complejas como los fangos de EDAR. Métodos convencionales, como HPLC o el colorimétrico presentan limitaciones en cuanto a sensibilidad, interferencias y requerimientos de preparación de muestra. En este sentido, hace falta una comparación entre las distintas tecnologías actuales y un estudio que cubra diversas muestras de fango de EDAR durante distintos periodos de tiempo de explotación de la EDAR. De esta forma, se podría comprobar y validar la selección de un método adecuado que permita cuantificar la concentración de ácido fítico en los fangos y poder ver así realmente el potencial que se tiene de liberación del P presente en este, en forma de ácido fítico.

Por otro lado, los resultados mostraron que la aplicación de enzimas fitasas en forma libre no es viable en un entorno real debido a la necesidad de su reposición constante. En contraste, el uso de enzimas encapsuladas mostró una mayor estabilidad y eficiencia, aunque su estabilidad a nivel estructural disminuye significativamente después de tres ciclos de reutilización. En este contexto, será fundamental continuar investigando nuevas estrategias de inmovilización en soportes más duraderos, tales como materiales híbridos orgánico-inorgánicos o nanopartículas funcionalizadas, que puedan asegurar su uso durante una mayor cantidad de ciclos operativos y a la vez aseguren una actividad enzimática adecuada. También sería relevante explorar el uso de sistemas de liberación controlada que optimicen la disponibilidad enzimática en el medio.

Desde un punto de vista económico, aunque el uso de enzima libre no resultó rentable, el estudio económico realizado no incluyó aún el impacto del menor consumo enzimático derivado del uso de enzimas encapsuladas. Se propone por tanto una nueva evaluación tecno-económica basada en esta

formulación optimizada. Además, se considera imprescindible incorporar un análisis ambiental del ciclo de vida (ACV) que cuantifique los beneficios ambientales de la recuperación de P en forma de estruvita frente al uso de fertilizantes minerales convencionales. Dicho análisis permitiría considerar no solo costes económicos directos, sino también factores como la reducción del impacto ambiental, la menor huella de carbono, la disminución de emisiones de gases de efecto invernadero y la contribución a la reducción de residuos.

Una línea prometedora de investigación futura es el uso combinado de enzimas fitasas con enzimas celulolíticas, ya que numerosos estudios reportan un efecto sinérgico en diversos procesos de hidrólisis cuando se usa un coctel enzimático con un conjunto de enzimas que aporten diversas propiedades. Ensayos en condiciones controladas que combinen estas enzimas podrían aportar mejoras notables en los rendimientos de liberación de P y optimizar el proceso previo a la precipitación de estruvita.

En resumen, la hidrólisis enzimática muestra un alto potencial para mejorar la recuperación de P en EDAR, pero su implementación requiere optimizar métodos analíticos, técnicas de inmovilización y evaluar su viabilidad económica y ambiental. Estos avances son clave para impulsar procesos más sostenibles y alineados con la economía circular.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agabo-García, C., Pérez, M., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., & Solera, R. (2019). Biomethane production improvement by enzymatic pre-treatments and enhancers of sewage sludge anaerobic digestion. *Fuel*, 255, 115713. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115713>
- Ahlgren, J., Reitzel, K., De Brabandere, H., Gogoll, A., & Rydin, E. (2011). Release of organic P forms from lake sediments. *Water Research*, 45(2), 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.020>
- Ahmad, S., Ahmad, S., & Sheikh, J. N. (2023). Silica centered aerogels as advanced functional material and their applications: A review. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 611, 122322. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122322>
- Alexandratos, N. ; B. J. (2012). *World Agriculture Towards 2030/2050: The 2012 Revision*. <https://www.fao.org/3/a-ap106e.pdf>
- Andreasen, K. , P. G. , T. H. , & S. R. (1997). Reduction of nutrient emission by sludge hydrolysis. *Water Science and Technology*, 35(10). [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00215-1)
- Annaheim, K. E., Rufener, C. B., Frossard, E., & Bünemann, E. K. (2013). Hydrolysis of organic phosphorus in soil water suspensions after addition of phosphatase enzymes. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), 1203-1213. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0819-1>
- Anupama, V. N., Amrutha, P. N., Chitra, G. S., & Krishnakumar, B. (2008). Phosphatase activity in anaerobic bioreactors for wastewater treatment. *Water Research*, 42(10-11), 2796-2802. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.014>
- APHA, A. & W. (2022). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (24.a ed.). American Public Health Association.
- Avila, R., Carrero, E., Vicent, T., & Blánquez, P. (2021). Integration of enzymatic pretreatment and sludge co-digestion in biogas production from microalgae. *Waste Management*, 124, 254-263. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.01.042>
- Babatunde, A. O., & Zhao, Y. Q. (2007). Constructive Approaches Toward Water Treatment Works Sludge Management: An International Review of Beneficial Reuses. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(2), 129-164. <https://doi.org/10.1080/10643380600776239>
- Bahreini, G., Nazari, L., Ho, D., Flannery, C. C., Elbeshbishy, E., Santoro, D., & Nakhla, G. (2020). Enzymatic pre-treatment for enhancement of primary sludge fermentation. *Bioresource Technology*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123071>
- Baldwin, D. S. (2013). Organic phosphorus in the aquatic environment. En *Environmental Chemistry* (Vol. 10, Número 6, pp. 439-454). <https://doi.org/10.1071/EN13151>
-

- Balmér, P. (2004). Phosphorus recovery - an overview of potentials and possibilities. *Water Science and Technology*, 49(10), 185-190. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0640>
- Barat, R. (2004). *Estudio de la precipitación de fósforo inducida biológicamente en el tratamiento de aguas residuales*. Universitat Politècnica de València.
- Barat, R., Abella, M., Castella, P., Ferrer, J., & Seco, A. (2009). A novel waste sludge operation to minimize uncontrolled phosphorus precipitation and maximize the phosphorus recovery: a case study in Tarragona, Spain. *on Nutrient Recovery from Wastewater Streams*, 781.
- Barat, R., Serralta, J., Ruano, M. V., Jiménez, E., Ribes, J., Seco, A., & Ferrer, J. (2013). Biological Nutrient Removal Model No. 2 (BNRM2): a general model for wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 67(7), 1481-1489.
- Barquet, K., Järnberg, L., Rosemarin, A., & Macura, B. (2020). Identifying barriers and opportunities for a circular phosphorus economy in the Baltic Sea region. *Water Research*, 171, 115433. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115433>
- Baruah, K., Sahu, N. P., Pal, A. K., Jain, K. K., Debnath, D., & Mukherjee, S. C. (2007). Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. *Aquaculture Research*, 0(0), 070116074017002. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01624.x>
- Battistoni, P., De Angelis, A., Prisciandaro, M., Boccadoro, R., & Bolzonella, D. (2002). P removal from anaerobic supernatants by struvite crystallization: long term validation and process modelling. *Water Research*, 36(8), 1927-1938. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00401-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00401-8)
- Beavers, A. (2014). *Recurrent selection to alter seed phytic acid content and iron bioavailability in maize* [Master's thesis, Iowa State University]. <https://search.proquest.com/openview/06c5658c6f290f2441c3b04a43826668/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>
- Bhat, G., & Kandagor, V. (2014). Synthetic polymer fibers and their processing requirements. En *Advances in Filament Yarn Spinning of Textiles and Polymers* (pp. 3-30). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857099174.1.3>
- Borie, F. , & B. J. M. (1981). *Ciclo del fósforo, 1: Formas del elemento en los suelos y su disponibilidad para plantas y microorganismos*. 40.
- Bouzas, A., Gabaldón, C., Marzal, P., Peña-roja, J. M., & Seco, A. (2002). Fermentation of Municipal Primary Sludge: Effect of Srt and Solids Concentration on Volatile Fatty Acid Production. *Environmental Technology*, 23(8), 863-875. <https://doi.org/10.1080/09593332308618359>
- Bouzas, A., Martí, N., Grau, S., Barat, R., Mangin, D., & Pastor, L. (2019). Implementation of a global P-recovery system in urban wastewater treatment plants. *Journal of Cleaner Production*, 227, 130-140.

- Bouzas, A., Ribes, J., Ferrer, J., & Seco, A. (2007). Fermentation and elutriation of primary sludge: Effect of SRT on process performance. *Water Research*, 41(4), 747-756. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.034>
- Bradshaw, N. (2019). *The abundance, persistence and mineralisation of phytate (myo-inositol hexakisphosphate) in monogastric faecal waste and soil*.
- Brady, N. C. , & W. R. R. (2002). Soil phosphorus and potassium. En Prentice Hall (Ed.), *The Nature and Properties of Soils* (13th edition).
- Bravo, H. R., Bootsma, H., & Khazaei, B. (2019). Fate of phosphorus from a point source in the Lake Michigan nearshore zone. *Journal of Great Lakes Research*, 45(6), 1182-1196. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.09.007>
- Bull, M. (1984). The distribution of bacterial activity in an anaerobic fluidized bed reactor. *Water Research*, 18(8), 1017-1020. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90253-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90253-7)
- Bunce, J. T., Ndam, E., Ofiteru, I. D., Moore, A., & Graham, D. W. (2018). A review of phosphorus removal technologies and their applicability to small-scale domestic wastewater treatment systems. En *Frontiers in Environmental Science* (Vol. 6, Número FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00008>
- Bünemann, E. K. (2008). Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2116-2129. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.001>
- Burgess, J. E., & Pletschke, B. I. (2018). Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini-review. *Water SA*, 34(3), 343. <https://doi.org/10.4314/wsa.v34i3.180627>
- Burton, F. L. , T. G. , T. R. , D. S. H. & M. & E. Inc. (2014). *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. McGraw-Hill.
- Cai, W., & Gupta, R. B. (2002). Hydrogels. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0825041807211620.a01>
- Canquil, N., Villarroel, M., Bravo, S., Vergara, C., & Shene, C. (2008). Parámetros cinéticos de la fitasa extracelular de *Penicillium expansum*. *Afinidad: Revista de química teórica y aplicada*, 65(538), 451-456.
- Carrere, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., & Ferrer, I. (2016). Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: from lab-scale research to full-scale application. *Bioresource technology*, 199, 386-397.
- Carrillo, V., Castillo, R., Magrí, A., Holzapfel, E., & Vidal, G. (2024). Phosphorus recovery from domestic wastewater: A review of the institutional framework. *Journal of Environmental Management*, 351. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119812>

- Carrillo, V., Fuentes, B., Gómez, G., & Vidal, G. (2020). Characterization and recovery of phosphorus from wastewater by combined technologies. En *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 19, Número 2, pp. 389-418). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09533-1>
- Cerdà Esquiva, I. (2023). *Desenvolupament de suports de poliacrilamida per a immobilitzar enzims. Validació de l'activitat enzimàtica* [Treball de Final de Grau en Biotecnologia]. Universitat de València.
- Chanona, J., Ribes, J., Seco, A., & Ferrer, J. (2006). Optimum design and operation of primary sludge fermentation schemes for volatile fatty acids production. *Water Research*, 40(1), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.020>
- Chen, H. (2003). Phosphatase activity and P fractions in soils of an 18-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation. *Forest Ecology and Management*, 178(3), 301-310. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00478-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00478-4)
- Chi, X., Li, A., Li, M., Ma, L., Tang, Y., Hu, B., & Yang, J. (2018). Influent characteristics affect biodiesel production from waste sludge in biological wastewater treatment systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 132, 226-235. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.04.010>
- Cieřlik, B., & Konieczka, P. (2017). A review of phosphorus recovery methods at various steps of wastewater treatment and sewage sludge management. The concept of “no solid waste generation” and analytical methods. En *Journal of Cleaner Production* (Vol. 142, pp. 1728-1740). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.116>
- Confederación Hidrográfica del Ebro. (2023). *Plan Hidrológico de la Demarcación Hidrográfica del Ebro 2022–2027*. <https://www.chebro.es/plan-hidrologico-2022-2027>
- Cordell, D., Drangert, J.-O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292-305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Correll, D. (1999). Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. *Poultry Science*, 78(5), 674-682. <https://doi.org/10.1093/ps/78.5.674>
- Cosgrove, D. J. (1973). *Inositol Polyphosphates in Activated Sludge*. 2, 483-485.
- Criquet, S., Braud, A., & Neble, S. (2007). Short-term effects of sewage sludge application on phosphatase activities and available P fractions in Mediterranean soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(4), 921-929. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.11.002>
- Criquet, S., Ferre, E., Farnet, A. M., & Le petit, J. (2004). Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(7), 1111-1118. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.02.021>

- Crites, R. , & T. G. (1998). *Small and Decentralized Wastewater Management Systems*. WCB/McGraw-Hill.
- Darch, T., Blackwell, M. S. A., Chadwick, D., Haygarth, P. M., Hawkins, J. M. B., & Turner, B. L. (2016). Assessment of bioavailable organic phosphorus in tropical forest soils by organic acid extraction and phosphatase hydrolysis. *Geoderma*, 284, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.08.018>
- Datta, R. (2024). Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. *Heliyon*, 10(1), e24022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24022>
- de Arriaga, M. D. (1979). *Cinética enzimática: manejo de datos*. Universidad de Oviedo.
- De Boer, M. A., Romeo-Hall, A. G., Rooimans, T. M., & Slootweg, J. C. (2018). An Assessment of the Drivers and Barriers for the Deployment of Urban Phosphorus Recovery Technologies: A Case Study of The Netherlands. *Sustainability*, 10(6), 1790. <https://doi.org/10.3390/su10061790>
- de Ruesga Valdivia, M. D. C. ; A. G. V. ; R. R. M. O. ; N. A. (s. f.). *Estudio de la capacidad hidrolética y sintética de fitasa de Aspergillus niger en medio acuoso y sintético*. Recuperado 18 de junio de 2025, de https://smbb.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_I/CI-01.pdf
- De Souza, M. G. ; de G. Y. F. ; R. A. L. ; P. J. L. ; G. P. J. ; O. B. ; de G. B. R. (2014). Hidrogeles de Poli (acrilamida): Evaluación de su comportamiento en fluido fisiológico simulado (SBF). . *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(4), 198-210.
- de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2004). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). *Water Research*, 38(19), 4222-4246. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.014>
- Delgado, A., & Scalenghe, R. (2008). Aspects of phosphorus transfer from soils in Europe. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171(4), 552-575. <https://doi.org/10.1002/jpln.200625052>
- Desmidt, E., Ghyselbrecht, K., Zhang, Y., Pinoy, L., Van der Bruggen, B., Verstraete, W., Rabaey, K., & Meesschaert, B. (2015). Global Phosphorus Scarcity and Full-Scale P-Recovery Techniques: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(4), 336-384. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.866531>
- Di Capua, F., de Sario, S., Ferraro, A., Petrella, A., Race, M., Pirozzi, F., Fratino, U., & Spasiano, D. (2022). Phosphorous removal and recovery from urban wastewater: Current practices and new directions. *Science of The Total Environment*, 823, 153750. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153750>
- Ding, H. H., Chang, S., & Liu, Y. (2017). Biological hydrolysis pretreatment on secondary sludge: Enhancement of anaerobic digestion and mechanism study. *Bioresource Technology*, 244, 989-995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.064>
-

- Dutta, P. K., Ravikumar, M. N. V., & Dutta, J. (2002). Chitin and chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 42(3), 307-354. <https://doi.org/10.1081/MC-120006451>
- Egle, L., Rechberger, H., Krampe, J., & Zessner, M. (2016). Phosphorus recovery from municipal wastewater: An integrated comparative technological, environmental and economic assessment of P recovery technologies. *Science of the Total Environment*, 571, 522-542. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.019>
- Egle, L., Rechberger, H., & Zessner, M. (2015). Overview and description of technologies for recovering phosphorus from municipal wastewater. *Resources, Conservation and Recycling*, 105, 325-346. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.09.016>
- Essel, T., Koomson, A., Seniagya, M.-P., Cobbold, G., Kwofie, S., Asimeng, B., Arthur, P., Awandare, G., & Tiburu, E. (2018). Chitosan Composites Synthesized Using Acetic Acid and Tetraethylorthosilicate Respond Differently to Methylene Blue Adsorption. *Polymers*, 10(5), 466. <https://doi.org/10.3390/polym10050466>
- Estevinho, B. N., Damas, A. M., Martins, P., & Rocha, F. (2014). Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. *Food Research International*, 64, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>
- Estevinho, B. N., Ramos, I., & Rocha, F. (2015). Effect of the pH in the formation of β -galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 238-242. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.049>
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 31(2), 138-155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.04.001>
- European Commission, J. R. C. (2018). *RECARE: Preventing and remediating degradation of soils in Europe through Land Care*. <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/projects/recare>
- European Parliament and Council. (2010). *Directive 2010/75/EU, on industrial emissions (integrated pollution prevention and control)*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0075>.
- European Parliament and Council. (2011). *Directive 2011/92/EU, on the assessment of the effects of certain public and private projects on the environment*.
- European Parliament and Council. (2019). *Regulation (UE) 2019/1009, laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R1009&qid=1690818844076>.

- European Parliament and Council. (2008). *Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0098>
- Fageria, N. K., Moreira, A., & dos Santos, A. B. (2013). PHOSPHORUS UPTAKE AND USE EFFICIENCY IN FIELD CROPS. *Journal of Plant Nutrition*, 36(13), 2013-2022. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.816728>
- Ferrer, J., Seco, A., Serralta, J., Ribes, J., Manga, J., Asensi, E., Morenilla, J. J., & Llavador, F. (2008). DESASS: a software tool for designing, simulating and optimising WWTPs. *Environmental Modelling & Software*, 23(1), 19-26.
- Ferris, C. P., McCoy, M. A., Patterson, D. C., & Kilpatrick, D. J. (2010). Effect of offering dairy cows diets differing in phosphorus concentration over four successive lactations: 2. Health, fertility, bone phosphorus reserves and nutrient utilisation. *Animal*, 4(4), 560-571. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991340>
- Garske, B., Stubenrauch, J., & Ekardt, F. (2020). Sustainable phosphorus management in European agricultural and environmental law. *Review of European, Comparative & International Environmental Law*, 29(1), 107-117. <https://doi.org/10.1111/reel.12318>
- Gebremariam, S. Y., Beutel, M. W., Christian, D., & Hess, T. F. (2011). Research Advances and Challenges in the Microbiology of Enhanced Biological Phosphorus Removal—A Critical Review. *Water Environment Research*, 83(3), 195-219. <https://doi.org/10.2175/106143010X12780288628534>
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H., & Matsuo, T. (s. f.). *ENZYME ACTIVITIES UNDER ANAEROBIC AND AEROBIC CONDITIONS IN ACTIVATED SLUDGE SEQUENCING BATCH REACTOR*.
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H., & Matsuo, T. (1998). Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Water Research*, 32(7), 2081-2088. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00425-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00425-9)
- Gon Kim, J., Hyun Kim, J., Moon, H.-S., Chon, C.-M., & Sung Ahn, J. (2002). Removal capacity of water plant alum sludge for phosphorus in aqueous solutions. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 14(1-4), 67-73. <https://doi.org/10.3184/095422902782775344>
- González-Sáiz, J. M., & Pizarro, C. (2001). Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Effect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on enzyme action and kinetics parameters. *European Polymer Journal*, 37(3), 435-444. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(00\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(00)00151-8)
- Gu, A. Z., Liu, L., Neethling, J. B., Stensel, H. D., & Murthy, S. (2011). Treatability and fate of various phosphorus fractions in different wastewater treatment processes. *Water Science and Technology*, 63(4), 804-810. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.312>
-

- Guo, Y., Guo, L., Sun, M., Zhao, Y., Gao, M., & She, Z. (2017). Effects of hydraulic retention time (HRT) on denitrification using waste activated sludge thermal hydrolysis liquid and acidogenic liquid as carbon sources. *Bioresource Technology*, 224, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.056>
- Harland, B. F., & Oberleas, D. (1987a). Phytate in Foods. En *World Review of Nutrition and Dietetics* (pp. 235-259). <https://doi.org/10.1159/000415199>
- Harland, B. F., & Oberleas, D. (1987b). Phytate in Foods. En *World Review of Nutrition and Dietetics* (pp. 235-259). <https://doi.org/10.1159/000415199>
- Harrison, E. Z., Oakes, S. R., Hysell, M., & Hay, A. (2006). Organic chemicals in sewage sludges. *Science of The Total Environment*, 367(2-3), 481-497. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.04.002>
- Haug, W., & Lantzsich, H. (1983). Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(12), 1423-1426. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740341217>
- Heinzmann, B. (2005). Phosphorus recycling in sewage treatment plants with biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*, 52(10-11), 543-548. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0734>
- Henze, M. . (2000). *Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3*. IWA Pub.
- Henze, M. . (2008). *Biological wastewater treatment : principles, modelling and design*. IWA Pub.
- Hertzer, P. ; D. L. ; R. C. ; B. J. ; S. D. ; B. J. (2010). *Nutrient Control Design Manual*. https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=227683
- Hjorth, M., Christensen, K. V., Christensen, M. L., & Sommer, S. G. (2011). Solid-Liquid Separation of Animal Slurry in Theory and Practice. En *Sustainable Agriculture Volume 2* (pp. 953-986). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_43
- Hollander, V. P. (1971). 19 *Acid Phosphatases* (pp. 449-498). [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60379-0](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60379-0)
- Hoppe, H. G. (2003). Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia*, 493(1-3), 187-200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1025453918247>
- Hukari, S., Hermann, L., & Nätötorp, A. (2016). From wastewater to fertilisers — Technical overview and critical review of European legislation governing phosphorus recycling. *Science of The Total Environment*, 542, 1127-1135. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.064>
- Humer, E., Schwarz, C., & Schedle, K. (2015a). Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), 605-625. <https://doi.org/10.1111/jpn.12258>
- Humer, E., Schwarz, C., & Schedle, K. (2015b). Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), 605-625. <https://doi.org/10.1111/jpn.12258>

- Hutnik, N., Kozik, A., Mazienczuk, A., Piotrowski, K., Wierzbowska, B., & Matynia, A. (2013). Phosphates (V) recovery from phosphorus mineral fertilizers industry wastewater by continuous struvite reaction crystallization process. *Water Research*, 47(11), 3635-3643. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.026>
- Ibrahim, M., Iqbal, M., Tang, Y.-T., Khan, S., Guan, D.-X., & Li, G. (2022). Phosphorus Mobilization in Plant–Soil Environments and Inspired Strategies for Managing Phosphorus: A Review. *Agronomy*, 12(10), 2539. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102539>
- J Ferrer, A. S. A. Robles. (2017). *Tratamientos biológicos de aguas residuales* (3a edición). Universitat Politècnica de València.
- Jaffer, Y., Clark, T. A., Pearce, P., & Parsons, S. A. (2002). Potential phosphorus recovery by struvite formation. *Water Research*, 36(7), 1834-1842. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00391-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00391-8)
- Joung, H., Jeun, B. Y., Li, S. J., Kim, J., Woodhouse, L. R., King, J. C., Welch, R. M., & Paik, H. Y. (2007). Fecal phytate excretion varies with dietary phytate and age in women. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(3), 295-302. <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719614>
- Juma, N. G., & Tabatabai, M. A. (1977). Effects of Trace Elements on Phosphatase Activity in Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 41(2), 343-346. <https://doi.org/10.2136/sssaj1977.03615995004100020034x>
- Jupp, A. R., Beijer, S., Narain, G. C., Schipper, W., & Slootweg, J. C. (2021). Phosphorus recovery and recycling – closing the loop. *Chemical Society Reviews*, 50(1), 87-101. <https://doi.org/10.1039/D0CS01150A>
- Kabbe, C. (2017). *Overview of Phosphorus Recovery from the Wastewater Stream Facilities Operating or under Construction*. P-REX nureg4org. https://www.phosphorusplatform.eu/images/download/Kabbe_Tech_implementation-Table_20170208.pdf
- Kim, Y.-O., Kim, H.-K., Bae, K.-S., Yu, J.-H., & Oh, T.-K. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(1), 2-7. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00096-3)
- Kirkby, E. A., & Johnston, A. E. (2008). *Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition* (pp. 177-223). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8435-5_9
- Kloeke, F. V. O. (1999). Localization and Identification of Populations of Phosphatase-Active Bacterial Cells Associated with Activated Sludge Flocs. *Microbial Ecology*, 38(3), 201-214. <https://doi.org/10.1007/s002489900170>
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>

- Kumar, V., & Sinha, A. K. (2018). General aspects of phytases. En *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives* (pp. 53-72). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00003-4>
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1921-1971. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00007-7)
- Kvakić, M., Pellerin, S., Ciais, P., Achat, D. L., Augusto, L., Denoroy, P., Gerber, J. S., Goll, D., Mollier, A., Mueller, N. D., Wang, X., & Ringeval, B. (2018). Quantifying the Limitation to World Cereal Production Due To Soil Phosphorus Status. *Global Biogeochemical Cycles*, 32(1), 143-157. <https://doi.org/10.1002/2017GB005754>
- Lahav, O., Telzhensky, M., Zewuhn, A., Gendel, Y., Gerth, J., Calmano, W., & Birnhack, L. (2013). Struvite recovery from municipal-wastewater sludge centrifuge supernatant using seawater NF concentrate as a cheap Mg(II) source. *Separation and Purification Technology*, 108, 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.002>
- Lal, R. (2016). Phosphorus and the environment. En *Soil Phosphorus* (pp. 209-224). CRC Press.
- Langhans, C., Beusen, A. H. W., Mogollón, J. M., & Bouwman, A. F. (2021). Phosphorus for Sustainable Development Goal target of doubling smallholder productivity. *Nature Sustainability*, 5(1), 57-63. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00794-4>
- Le Corre, K. S., Valsami-Jones, E., Hobbs, P., & Parsons, S. A. (2009). Phosphorus recovery from wastewater by struvite crystallization: A review. En *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 39, Número 6, pp. 433-477). <https://doi.org/10.1080/10643380701640573>
- Li, C., Liu, S., Ma, T., Zheng, M., & Ni, J. (2019). Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in a sequencing batch reactor (SBR) under low temperature. *Chemosphere*, 229, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.185>
- Li, L., Pang, H., He, J., & Zhang, J. (2019). Characterization of phosphorus species distribution in waste activated sludge after anaerobic digestion and chemical precipitation with Fe³⁺ and Mg²⁺. *Chemical Engineering Journal*, 373, 1279-1285. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.146>
- Li, X., Zhu, T., Zhang, K., Lv, L., Chai, T., Shen, Y., Wang, Y., You, M., & Xie, Y. (2016). Effect of the sequence ultrasonic operation on anaerobic degradation of sewage sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 112, 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.006>
- Li, Y., & Chróst, R. J. (2006). Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 568-572. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.028>
- Liang, T., Elmaadawy, K., Liu, B., Hu, J., Hou, H., & Yang, J. (2021). Anaerobic fermentation of waste activated sludge for volatile fatty acid production: Recent updates of pretreatment

- methods and the potential effect of humic and nutrients substances. *Process Safety and Environmental Protection*, 145, 321-339. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.08.010>
- Liu, J., Yuan, Y., Li, B., Zhang, Q., Wu, L., Li, X., & Peng, Y. (2017). Enhanced nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater in an anaerobic-aerobic-anoxic sequencing batch reactor with sludge fermentation products as carbon source. *Bioresource Technology*, 244, 1158-1165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.055>
- Liu, X., Hu, Z., Zhu, C., Wen, G., Meng, X., & Lu, J. (2013). Influence of process parameters on phosphorus recovery by struvite formation from urine. *Water Science and Technology*, 68(11), 2434-2440. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.514>
- Liu, X., Li, A., Ma, L., Jing, Z., Yang, J., Tang, Y., & Hu, B. (2020). A comparison on phosphorus release and struvite recovery from waste activated sludge by different treatment methods. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104878>
- Lotfi Aski, A., Borghei, A., Zenouzi, A., Ashrafi, N., & Taherzadeh, M. J. (2020). Steam Explosion Pretreatment of Sludge for Pharmaceutical Removal and Heavy Metal Release to Improve Biodegradability and Biogas Production. *Fermentation*, 6(1), 34. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010034>
- Lu, Q., He, Z. L., & Stoffella, P. J. (2012). Land Application of Biosolids in the USA: A Review. *Applied and Environmental Soil Science*, 2012, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/201462>
- Martí, I. (2022). *Dióxido de carbono supercrítico como disolvente sostenible para polimerizaciones en heterofase* [Trabajo Fin de Máster]. Universitat de València.
- Martí, N., Barat, R., Seco, A., Pastor, L., & Bouzas, A. (2017). Sludge management modeling to enhance P-recovery as struvite in wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management*, 196, 340-346. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.074>
- Marti, N., Ferrer, J., Seco, A., & Bouzas, A. (2008). Optimisation of sludge line management to enhance phosphorus recovery in WWTP. *Water research*, 42(18), 4609-4618.
- Marti, N., Pastor, L., Bouzas, A., Ferrer, J., & Seco, A. (2010). Phosphorus recovery by struvite crystallization in WWTPs: Influence of the sludge treatment line operation. *Water research*, 44(7), 2371-2379.
- Mathur, A. M., Moorjani, S. K., & Scranton, A. B. (1996). Methods for Synthesis of Hydrogel Networks: A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 36(2), 405-430. <https://doi.org/10.1080/15321799608015226>
- McConville, J., Drangert, J.-O., Tidåker, P., Neset, T.-S., Rauch, S., Strid, I., & Tonderski, K. (2015). Closing the food loops: guidelines and criteria for improving nutrient management. *Sustainability: Science, Practice and Policy*, 11(2), 33-43. <https://doi.org/10.1080/15487733.2015.11908144>

- Mehta, C. M., Khunjar, W. O., Nguyen, V., Tait, S., & Batstone, D. J. (2015). Technologies to recover nutrients from waste streams: A critical review. En *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 45, Número 4, pp. 385-427). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.866621>
- Metcalf & Eddy, Inc. (1995). *Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización*. McGraw-Hill Interamericana.
- Michael H. Gerardi. (2003). Anaerobic Digestion Stages. En *The Microbiology of Anaerobic Digesters* (pp. 51-57). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471468967.ch7>
- Mihelcic, J. R., Fry, L. M., & Shaw, R. (2011). Global potential of phosphorus recovery from human urine and feces. *Chemosphere*, 84(6), 832-839. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.046>
- Ministerio de Agricultura, A. y M. A. (2015). *Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en España 2015*. https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/publicaciones-archivo-biblioteca/publicaciones/memoria_magrama_2015_completo_tcm30-83965.pdf
- Minnesota Pollution Control Agency. (2011). *Biological Nutrient Removal Manual*.
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J. M., Rodelas, B., Pozo, C., Manzanera, M., Hontoria, E., & Gonzalez-Lopez, J. (2010). Microbial enzymatic activities in a pilot-scale MBR experimental plant under different working conditions. *Bioresource Technology*, 101(2), 696-704. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.071>
- Molinos-Senante, M., Hernández-Sancho, F., Sala-Garrido, R., & Garrido-Baserba, M. (2011). Economic Feasibility Study for Phosphorus Recovery Processes. *AMBIO*, 40(4), 408-416. <https://doi.org/10.1007/s13280-010-0101-9>
- Mondragón, R., Julia, J. E., Barba, A., & Jarque, J. C. (2013). El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 52(4), 159-168. <https://doi.org/10.3989/cyv.212013>
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., & Carrère, H. (2013). Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(3), 260-322. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.604258>
- Moosbrugger, R. E. ; W. M. C. ; E. G. A. (1992). *Simple titration procedures to determine H₂CO₃* alkalinity and short-chain fatty acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulfide weak acid/bases*.
- Morgenschweis, C. ; V. L. ; van S. L. ; L. I. (2015). *Exploration of the quality of struvite from the municipal wastewater chain*. <https://www.stowa.nl/sites/default/files/assets/PUBLICATIES/Publicaties%202015/STOWA%202015-34.pdf>

- Mosén, K., Bäckström, K., Thalberg, K., Schaefer, T., Axelsson, A., & Kristensen, H. G. (2006). The apparent plasticizing effect of polyethylene glycol (PEG) on the crystallinity of spray dried lactose/PEG composites. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(2), 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.05.015>
- Mulkerrins, D., Dobson, A. D. W., & Colleran, E. (2004). Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environment International*, 30(2), 249-259. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00177-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00177-6)
- Musvoto, E. (2000). Integrated chemical€“physical processes modelling€”II. simulating aeration treatment of anaerobic digester supernatants. *Water Research*, 34(6), 1868-1880. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00335-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00335-8)
- Muys, M., Phukan, R., Brader, G., Samad, A., Moretti, M., Haiden, B., Pluchon, S., Roest, K., Vlaeminck, S. E., & Spiller, M. (2021). A systematic comparison of commercially produced struvite: Quantities, qualities and soil-maize phosphorus availability. *Science of The Total Environment*, 756, 143726. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143726>
- Nedelciu, C. E., Ragnarsdottir, K. V., Schlyter, P., & Stjernquist, I. (2020). Global phosphorus supply chain dynamics: Assessing regional impact to 2050. *Global Food Security*, 26, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100426>
- Neethling, J. B., Clark, D., Pramanik, A., Stensel, H. D., Sandino, J., & Tsuchihashi, R. (2010). WERF Nutrient Challenge investigates limits of nutrient removal technologies. *Water Science and Technology*, 61(4), 945-953. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.617>
- Nelson, N. O., Mikkelsen, R. L., & Hesterberg, D. L. (2003). Struvite precipitation in anaerobic swine lagoon liquid: effect of pH and Mg:P ratio and determination of rate constant. *Bioresource Technology*, 89(3), 229-236. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00076-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00076-2)
- Noukeu, N. A., Gouado, I., Priso, R. J., Ndongo, D., Taffouo, V. D., Dibong, S. D., & Ekodeck, G. E. (2016). Characterization of effluent from food processing industries and stillage treatment trial with *Eichhornia crassipes* (Mart.) and *Panicum maximum* (Jacq.). *Water Resources and Industry*, 16, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.wri.2016.07.001>
- Nybroe, O., Jørgensen, P. E., & Henze, M. (1992). Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Water Research*, 26(5), 579-584. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(92\)90230-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(92)90230-2)
- Ohlinger, K. N., P.E., Young, T. M., & Schroeder, E. D. (1999). Kinetics Effects on Preferential Struvite Accumulation in Wastewater. *Journal of Environmental Engineering*, 125(8), 730-737. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1999\)125:8\(730\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1999)125:8(730))
- Oshima, Y., Ogawa, N., & Harashima, S. (1996). Regulation of phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* — a review. *Gene*, 179(1), 171-177. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00425-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00425-8)
-

- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2024). *Directiva (UE) 2024/3019 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de noviembre de 2024*. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2024-81831>
- Parsons, S. A., & Smith, J. A. (2008). Phosphorus Removal and Recovery from Municipal Wastewaters. *Elements*, 4(2), 109-112. <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.109>
- Pastor, L. (2008). *Estudio de la precipitación y recuperación del fósforo presente en las aguas residuales en forma de estruvita*. Universitat Politècnica de València.
- Pelaz, L., Gómez, A., Letona, A., Garralón, G., & Fdz-Polanco, M. (2018). Nitrogen removal in domestic wastewater. Effect of nitrate recycling and COD/N ratio. *Chemosphere*, 212, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.052>
- Peng, X.-L., Chen, L., Lv, Z.-W., Hao, G.-J., & Fang, H.-L. (2010). Characterization of Phosphorus in Sewage Sludge from Different Sources by ³¹ Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41(10), 1237-1244. <https://doi.org/10.1080/00103621003721429>
- Perot, C., Sargent, M., Richard, P., Luu, R. P. T., & Millot, N. (1988). The effects of pH, temperature and agitation speed on sludge anaerobic hydrolysis-acidification. *Environmental Technology Letters*, 9(8), 741-752. <https://doi.org/10.1080/09593338809384628>
- Petriglieri, F., Petersen, J. F., Peces, M., Nierychlo, M., Hansen, K., Baastrand, C. E., Nielsen, U. G., Reitzel, K., & Nielsen, P. H. (2022). Quantification of Biologically and Chemically Bound Phosphorus in Activated Sludge from Full-Scale Plants with Biological P-Removal. *Environmental Science & Technology*, 56(8), 5132-5140. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02642>
- Petzet, S., & Cornel, P. (2012). Prevention of Struvite Scaling in Digesters Combined With Phosphorus Removal and Recovery—The FIX-Phos Process. *Water Environment Research*, 84(3), 220-226. <https://doi.org/10.2175/106143012X13347678384125>
- PHORWater. (s. f.). *Phosphorus recovery from wastewater*. Recuperado 17 de junio de 2025, de <https://phorwater.eu/>
- Pierre, A. C. (2004). The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(3), 145-170. <https://doi.org/10.1080/10242420412331283314>
- Ragsdale, D. (2007). *Advanced wastewater treatment to achieve low concentration of phosphorus*.
- Ran, X., Tejaswi Uppuluri, N. S., Deng, Y., Wang, S., Ni, Z., Hu, J., Müller, J., Dong, R., Guo, J., & Oechsner, H. (2025). Phosphorus bioavailability and recycling potential in various organic Waste: Assessment by enzymatic hydrolysis and ³¹P NMR. *Bioresource Technology*, 416. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131790>

- Rashed, I. G. A. A., Akunna, J., El-Halwany, M. M., & Atiaa, A. F. F. A. (2010). Improvement in the efficiency of hydrolysis of anaerobic digestion in sewage sludge by the use of enzymes. *Desalination and Water Treatment*, 21(1-3), 280-285. <https://doi.org/10.5004/dwt.2010.1575>
- Rittmann, B. E. ; M. P. L. (2012). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw Hill Education.
- Rittmann, B. E., Mayer, B., Westerhoff, P., & Edwards, M. (2011a). Capturing the lost phosphorus. En *Chemosphere* (Vol. 84, Número 6, pp. 846-853). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.001>
- Rittmann, B. E., Mayer, B., Westerhoff, P., & Edwards, M. (2011b). Capturing the lost phosphorus. En *Chemosphere* (Vol. 84, Número 6, pp. 846-853). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.001>
- Roldán, M., Bouzas, A., Seco, A., Mena, E., Mayor, Á., & Barat, R. (2020). An integral approach to sludge handling in a WWTP operated for EBPR aiming phosphorus recovery: Simulation of alternatives, LCA and LCC analyses. *Water Research*, 175, 115647. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115647>
- Roy, S., Nagabooshanam, S., Chauhan, N., Mathur, A., Wadhwa, S., Jain, U., & Davis, J. (2023). Recent advances in bioelectroanalytical sensors based on molecularly imprinted polymeric surfaces. En *Multifaceted Bio-sensing Technology* (pp. 111-134). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90807-8.00009-9>
- Ruzhitskaya, O., & Gogina, E. (2017). Methods for Removing of Phosphates from Wastewater. *MATEC Web of Conferences*, 106, 07006. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201710607006>
- Saavedra, C., & Delgado, A. (2005). Phosphorus Fractions and Release Patterns in Typical Mediterranean Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 69(3), 607-615. <https://doi.org/10.2136/sssaj2004.0156>
- Sangave, P. C., & Pandit, A. B. (2006). Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. *Journal of Environmental Management*, 78(1), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.03.012>
- Santa-Maria, M., Scher, H., & Jeoh, T. (2012). Microencapsulation of bioactives in cross-linked alginate matrices by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 29(3), 286-295. <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.651494>
- Sarvajayakesavalu, S., Lu, Y., Withers, Paul. J. A., Pavinato, P. S., Pan, G., & Chareonsudjai, P. (2018). Phosphorus recovery: a need for an integrated approach. *Ecosystem Health and Sustainability*, 4(2), 48-57. <https://doi.org/10.1080/20964129.2018.1460122>
- Sedlak, RichardI. (2018). *Phosphorus and Nitrogen Removal from Municipal Wastewater* (R. Sedlak, Ed.). Routledge. <https://doi.org/10.1201/9780203743546>

- Selman, M. ; G. S. (2007). *Eutrophication: An Overview of Status, Trends, Policies, and Strategies*. http://pdf.wri.org/eutrophication_policies_actions_and_strategies.pdf
- Shaddel, S., Bakhtiary-Davijany, H., Kabbe, C., Dadgar, F., & Østerhus, S. (2019). Sustainable Sewage Sludge Management: From Current Practices to Emerging Nutrient Recovery Technologies. *Sustainability*, 11(12), 3435. <https://doi.org/10.3390/su11123435>
- Shen, N., & Zhou, Y. (2016). Enhanced biological phosphorus removal with different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(11), 4735-4745. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7518-4>
- Sichler, T. C., Montag, D., Barjenbruch, M., Mauch, T., Sommerfeld, T., Ehm, J.-H., & Adam, C. (2022). Variation of the element composition of municipal sewage sludges in the context of new regulations on phosphorus recovery in Germany. *Environmental Sciences Europe*, 34(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00658-4>
- Skalsky, D. S., & Daigger, G. T. (1995). Wastewater solids fermentation for volatile acid production and enhanced biological phosphorus removal. *Water Environment Research*, 67(2), 230-237. <https://doi.org/10.2175/106143095X131402>
- Smith, M. T. E., Cade-Menun, B. J., & Tibbett, M. (2006). Soil phosphorus dynamics and phytoavailability from sewage sludge at different stages in a treatment stream. *Biology and Fertility of Soils*, 42(3), 186-197. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0014-0>
- Song, Y.-H., Qiu, G.-L., Yuan, P., Cui, X.-Y., Peng, J.-F., Zeng, P., Duan, L., Xiang, L.-C., & Qian, F. (2011). Nutrients removal and recovery from anaerobically digested swine wastewater by struvite crystallization without chemical additions. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1-3), 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.015>
- Stephens, H. M., Neethling, J. B., Benisch, M., Gu, A. Z., & Stensel, H. D. (2004). COMPREHENSIVE ANALYSIS OF FULL-SCALE ENHANCED BIOLOGICAL PHOSPHORUS REMOVAL FACILITIES. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2004(8), 89-107. <https://doi.org/10.2175/193864704784136685>
- Stevenson, R. J. ; E. P. C. (2013). Nutrient pollution: a problem with solutions. En *River Conservation: Challenges and Opportunities* (pp. 77-103). Foundation BBVA.
- Stratful, I., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2001). Conditions influencing the precipitation of magnesium ammonium phosphate. *Water Research*, 35(17), 4191-4199. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00143-9)
- Sugiura, S. H., Gabaudan, J., Dong, F. M., & Hardy, R. W. (2001). Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)] fed soybean meal-based diets. *Aquaculture Research*, 32(7), 583-592. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00581.x>
-

- Sun, Y., Chen, Z., Wu, G., Wu, Q., Zhang, F., Niu, Z., & Hu, H.-Y. (2016). Characteristics of water quality of municipal wastewater treatment plants in China: implications for resources utilization and management. *Journal of Cleaner Production*, 131, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.068>
- Syeda, S. E. Z., Khan, M. S., & Skwierawska, A. M. (2024). Chitosan-based modalities with multifunctional attributes for adsorptive mitigation of hazardous metal contaminants from wastewater. *Desalination and Water Treatment*, 320, 100679. <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100679>
- Syers, J. K. ; J. A. E. ; C. D. (2008). *Efficiency of Soil and Fertilizer Phosphorus Use*. <https://www.fao.org/3/a1595e/a1595e00.htm>
- Taddeo, R., Honkanen, M., Kolppo, K., & Lepistö, R. (2018). Nutrient management via struvite precipitation and recovery from various agroindustrial wastewaters: Process feasibility and struvite quality. *Journal of Environmental Management*, 212, 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.027>
- Tajber, L., Corrigan, O. I., & Healy, A. M. (2009). Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their composites-II. Statistical factorial design and in vitro deposition properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 367(1-2), 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.029>
- Takiguchi, N., Kishino, M., Kuroda, A., Kato, J., & Ohtake, H. (2004). A Laboratory-Scale Test of Anaerobic Digestion and Methane Production after Phosphorus Recovery from Waste Activated Sludge. En *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* (Vol. 97, Número 6).
- Tchobanoglous, G. , B. F. L. , & S. H. D. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. McGraw-Hill, Inc.
- Teichgräber, B. (2000). Acidification of primary sludge to promote increased biological phosphorus elimination and denitrification. *Water Science and Technology*, 41(9), 163-170. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0196>
- Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 61-87. <https://doi.org/10.1080/10408690390826455>
- Tischer, W., & Wedekind, F. (1999). *Immobilized Enzymes: Methods and Applications* (pp. 95-126). https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7_4
- Tur, F., Tur, E., Lenthéric, I., Mendoza, P., Encabo, M., Isern, B., Grases, F., Maraschiello, C., & Perelló, J. (2013). Validation of an LC-MS bioanalytical method for quantification of phytate levels in rat, dog and human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 928, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.023>
-

- Turner, B. L., Mahieu, N., & Condon, L. M. (2003). Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments of Phosphorus Compounds in Soil NaOH-EDTA Extracts. *Soil Science Society of America Journal*, 67(2), 497-510. <https://doi.org/10.2136/sssaj2003.4970>
- Ucisik, A. S., & Henze, M. (2008). Biological hydrolysis and acidification of sludge under anaerobic conditions: The effect of sludge type and origin on the production and composition of volatile fatty acids☆. *Water Research*, 42(14), 3729-3738. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.06.010>
- United States Environmental Protection Agency. (1995). *EPA Environmental Justice Strategy 1995*. <https://www.epa.gov/environmentaljustice/epa-environmental-justice-strategy-1995>
- United States Environmental Protection Agency. (1998). *National Strategy for the Development of Regional Nutrient Criteria*. <https://udspace.udel.edu/items/6604c29a-3659-4814-a5df-67f17b6d04ee>
- Uysal, A., Yilmazel, Y. D., & Demirel, G. N. (2010). The determination of fertilizer quality of the formed struvite from effluent of a sewage sludge anaerobic digester. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1-3), 248-254. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.004>
- Vall, M., Zhang, P., Gao, A., Frykstrand, S., Cheung, O., & Strømme, M. (2017). Effects of amine modification of mesoporous magnesium carbonate on controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 524(1-2), 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.063>
- van Loosdrecht, M. C. M., & Salem, S. (2006). Biological treatment of sludge digester liquids. *Water Science and Technology*, 53(12), 11-20. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.401>
- van de Velde, F., Lourenço, N. D., Pinheiro, H. M., & Bakker, M. (2002). Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 344(8), 815-835. [https://doi.org/10.1002/1615-4169\(200209\)344:8<815::AID-ADSC815>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1615-4169(200209)344:8<815::AID-ADSC815>3.0.CO;2-H)
- Venkateshwaran, K., McNamara, P. J., & Mayer, B. K. (2018). Meta-analysis of non-reactive phosphorus in water, wastewater, and sludge, and strategies to convert it for enhanced phosphorus removal and recovery. *Science of The Total Environment*, 644, 661-674. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.369>
- Wang, L., Amelung, W., Prietzel, J., & Willbold, S. (2019). Transformation of organic phosphorus compounds during 1500 years of organic soil formation in Bavarian Alpine forests – A ³¹P NMR study. *Geoderma*, 340, 192-205. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.01.029>
- Wang, L. K. , I. V. , T. J. H. , & H. Y. T. (2010). *Environmental Biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Wang, Q., Raju, C. S., Almind-Jørgensen, N., Laustrop, M., Reitzel, K., & Nielsen, U. G. (2022). Variation in Phosphorus Speciation of Sewage Sludge throughout Three Wastewater Treatment Plants: Determined by Sequential Extraction Combined with Microscopy, NMR Spectroscopy,

and Powder X-ray Diffraction. *Environmental Science & Technology*, 56(12), 8975-8983. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01815>

Wang, Y., Zhang, W., Müller, T., Lakshmanan, P., Liu, Y., Liang, T., Wang, L., Yang, H., & Chen, X. (2023). Soil phosphorus availability and fractionation in response to different phosphorus sources in alkaline and acid soils: a short-term incubation study. *Scientific Reports*, 13(1), 5677. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31908-x>

Wang, Z., Wang, W., Zhang, X., & Zhang, G. (2009). Digestion of thermally hydrolyzed sewage sludge by anaerobic sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2-3), 799-803. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.103>

Wasaki, J., Yamamura, T., Shinano, T., & Osaki, M. (2003). Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant and Soil*, 248(1/2), 129-136. <https://doi.org/10.1023/A:1022332320384>

Wen, L., Yang, F., Li, X., Liu, S., Lin, Y., Hu, E., Gao, L., & Li, M. (2023). Composition of dissolved organic matter (DOM) in wastewater treatment plants influent affects the efficiency of carbon and nitrogen removal. *Science of The Total Environment*, 857, 159541. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159541>

Whiteley, C. G., Heron, P., Pletschke, B., Rose, P. D., Tshivhunge, S., Van Jaarsveld, F. P., & Whittington-Jones, K. (2002). The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate reducing systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 419-424. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00100-X)

Wild, D., Kisiakova, A., & Siegrist, H. (1997). Prediction of recycle phosphorus loads from anaerobic digestion. *Water Research*, 31(9), 2300-2308. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00059-6)

Woodley, A. A. Y. F. T. A. M. V. P. (2014). Nitrogen and Phosphorus Fertility Management in Organic Field Crop Production. En *Managing Energy, Nutrients, and Pests in Organic Field Crops* (pp. 81-128). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16044-12>

Worwąg, M. (2018). Recovery of phosphorus as struvite from sewage sludge and sewage sludge ash. *Desalination and Water Treatment*, 134, 121-127. <https://doi.org/10.5004/dwt.2018.22764>

Xie, C., Lu, R., Huang, Y., Wang, Q., & Xu, X. (2010). Effects of ions and phosphates on alkaline phosphatase activity in aerobic activated sludge system. *Bioresource Technology*, 101(10), 3394-3399. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.047>

Xie, C., Zhao, J., Tang, J., Xu, J., Lin, X., & Xu, X. (2011). The phosphorus fractions and alkaline phosphatase activities in sludge. *Bioresource Technology*, 102(3), 2455-2461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.011>

- Yang, Y., Tomlinson, D., Kennedy, S., & Zhao, Y. Q. . (2006). Dewatered alum sludge: a potential adsorbent for phosphorus removal. *Water Science and Technology*, 54(5), 207-213. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.564>
- Ye, Y., Ngo, H. H., Guo, W., Liu, Y., Zhang, X., Guo, J., Ni, B. jie, Chang, S. W., & Nguyen, D. D. (2016). Insight into biological phosphate recovery from sewage. *Bioresource Technology*, 218, 874-881. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.003>
- Yilmazel, Y. D., & Demirer, G. N. (2011). Removal and recovery of nutrients as struvite from anaerobic digestion residues of poultry manure. *Environmental Technology*, 32(7), 783-794. <https://doi.org/10.1080/09593330.2010.512925>
- Yu, B., Luo, J., Xie, H., Yang, H., Chen, S., Liu, J., Zhang, R., & Li, Y. Y. (2021). Species, fractions, and characterization of phosphorus in sewage sludge: A critical review from the perspective of recovery. En *Science of the Total Environment* (Vol. 786). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147437>
- Yu, L., Zhang, W., Liu, H., Wang, G., & Liu, H. (2018). Evaluation of volatile fatty acids production and dewaterability of waste activated sludge with different thermo-chemical pretreatments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 129, 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.02.008>
- Yuan, Q., Baranowski, M., & Oleszkiewicz, J. A. (2010). Effect of sludge type on the fermentation products. *Chemosphere*, 80(4), 445-449. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.026>
- Yuan, Q., Sparling, R., & Oleszkiewicz, J. A. (2009). Waste activated sludge fermentation: Effect of solids retention time and biomass concentration. *Water Research*, 43(20), 5180-5186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.019>
- Zhang, S. X. (2019). Identification of phosphorus species and bioavailability in primary, secondary and digested sludge. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(6). https://doi.org/10.15666/aeer/1706_1439114402
- Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of The Total Environment*, 612, 522-537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>
- Zhu, Q., Dai, L., Wang, Y., Tan, F., Chen, C., He, M., & Maeda, T. (2021). Enrichment of waste sewage sludge for enhancing methane production from cellulose. *Bioresource Technology*, 321, 124497. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124497>
- Zhu, Y., Wu, F., He, Z., Guo, J., Qu, X., Xie, F., Giesy, J. P., Liao, H., & Guo, F. (2013). Characterization of Organic Phosphorus in Lake Sediments by Sequential Fractionation and Enzymatic Hydrolysis. *Environmental Science & Technology*, 47(14), 7679-7687. <https://doi.org/10.1021/es305277g>
-

Zou, Y., Xiang, C., Sun, L. X., & Xu, F. (2008). Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO₂ sol-gel. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(7), 1010-1016.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.10.009>

7. ANEJOS

7.1. CALIBRACIÓN DEL MODELO BNRM2

7.1.1. DECANTACIÓN PRIMARIA

Tabla A 1. Valores de los parámetros de sedimentación de los decantadores primarios utilizados en la calibración del modelo.

Parámetro	Valor Utilizado
IVF ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)	25
V_0 ($\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	409
$V_{S\text{max}}$ ($\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	310
r_h ($\text{m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,00019
r_p ($\text{m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,006
f_{ns}	0,25

Tabla A 2. Resultados de la calibración del modelo con respecto a los decantadores primarios junto con los valores experimentales de octubre de 2018.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango purgado		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	204	204
SST ($\text{mg SST} \cdot \text{L}^{-1}$)	12.100	9.600
SSV (%)	84,1	70
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	24619	n.d.
DQO ₅ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	2098	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	55,5	n.d.
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	954	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	12,0	9,5
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	105	102
pH	6,4	6,5
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	170	n.d.
Efluente		
SST ($\text{mg SST} \cdot \text{L}^{-1}$)	68	52
SSV (%)	85	96
Eliminación SST (%)	75	71
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	404	344
DQO ₅ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	275	260
DBO ₅ ($\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$)	278	260
DBO _{5,5} ($\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$)	150	157
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	22,3	28,7
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	28,4	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	2,1	2,8
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	3,3	3,4
pH	7,1	7,2
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	245	400

7.1.2. FANGOS ACTIVADOS

Tabla A 3. Resultados de la calibración del modelo con respecto al proceso biológico de la Línea de Aguas de la EDAR de Calahorra, diferenciando entre fango de purga y recirculación y efluente del reactor biológico, junto con los valores experimentales de octubre de 2018.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Purga y Recirculación		
Caudal purga ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	272	347
Caudal recirculación externa ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	17.588	17.420
Caudal recirculación interna ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	17.123	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.811	6.250
SSV (%)	83	81
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	5.036	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,5	n.d.
N-NO ₃ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	0,4
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	300	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,9	0,5
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	119	121
Reactor biológico		
TRC (d)	30	30
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.256	3.040
SSV (%)	83	83
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	2986	n.d.
DQO _s ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	9	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,1	1,8
N-NO ₃ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	3,2	n.d.
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	181	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,5	0,1

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
P_T (mg P·L ⁻¹)	71	53,7
OD cámara aerobia 1 (mg·L ⁻¹)	1,5	n.d.
OD cámara aerobia 2 (mg·L ⁻¹)	1,3	n.d.
OD cámara aerobia 3 (mg·L ⁻¹)	1,3	n.d.

7.1.3. ESPESADOR DE FANGO PRIMARIO

Tabla A 4. Valores de los parámetros de los espesadores de fango primario en la calibración del modelo.

Parámetro	Valor Utilizado
IVF (mL·g ⁻¹)	27
V_0 (m·d ⁻¹)	409
V_{Smax} (m·d ⁻¹)	310
r_h (m ³ ·g ⁻¹)	0,000193
r_p (m ³ ·g ⁻¹)	0,0060
f_{ns}	0,0400

Tabla A 5. Resultados de la calibración del modelo con respecto a los espesadores de fango primario junto con los valores experimentales de octubre de 2018.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango espesado		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	59	60
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	35.168	56.200
SSV (%)	82	65
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	76.627	n.d.
DQO ₅ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	13.757	n.d.
AGV ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.796	2.453
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	269	51,2
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.029	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	42,0	38,2
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	306	430
pH	6,4	5,5
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	180	n.d.
Sobrenadante		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	145	144
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	592	n.d.
SSV (%)	83	n.d.
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.317	n.d.
DQO ₅ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.239	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	57,9	57,7
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	107	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	12,4	19,4
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	22,0	58,6
pH	6,3	n.d.
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	154	n.d.

7.1.4. ESPESADOR DE FANGO SECUNDARIO

Tabla A 6. Resultados de la calibración del modelo con respecto a los espesadores de fango secundario junto con los valores experimentales de octubre de 2018.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango espesado		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	17	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	57.700	57.700
SSV (%)	92	87
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	81.702	n.d.
DQO _s ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	11	n.d.
AGV ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,04	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	1,1	n.d.
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.623	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,8	n.d.
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.252	n.d.
pH	7,6	6,4
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	242,2	n.d.
Sobrenadante		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	255	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	200	200
SSV (%)	92	n.d.
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	294	n.d.
DQO _s ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	11	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	3,9	1,1
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	17,4	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	1,9	0,8
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	5,1	2,9
pH	7,6	n.d.
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	242,2	n.d.

7.1.5. CÁMARA DE MEZCLA

Tabla A 7. Valores de los parámetros estequiométricos correspondientes a los microorganismos de la cámara de mezcla utilizados en la calibración del modelo.

Parámetro	Unidad	Valor
<i>Hidrólisis acidogénicas</i>		
f_{SI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,05
<i>Bacterias acidogénicas</i>		
Y_{ACID}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,15
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
f_{AC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,58
f_{PRO}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,25
<i>Bacterias acetogénicas</i>		
Y_{PRO}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,05
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
f_{AC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,57
<i>Metanogénicas acetotróficas</i>		
Y_{MAC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,025
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
<i>Metanogénicas hidrogenotróficas</i>		
Y_{MH2}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,045
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20

Tabla A 8. Valores de los parámetros cinéticos correspondientes a los microorganismos de la cámara de mezcla utilizados en la calibración del modelo.

Parámetro	Unidad	Valor a 20°C
<i>Hidrólisis acidogénicas</i>		
K_H	d^{-1}	43,0
K_X	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	150
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
<i>Bacterias acidogénicas</i>		
μ_{ACID}	d^{-1}	1,28
b_{ACID}	d^{-1}	0,33
K_F	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	15
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_A	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	6500
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P \cdot m^{-3}$	0,01
<i>Bacterias acetogénicas</i>		
μ_{PRO}	d^{-1}	0,18
b_{PRO}	d^{-1}	0,03
K_{PRO}	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	10
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_{H_2}	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	0,60
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P \cdot m^{-3}$	0,01
<i>Metanogénicas acetotróficas</i>		
μ_{MAC}	d^{-1}	0,11
b_{MAC}	d^{-1}	0,03
K_A	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	30
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05

Parámetro	Unidad	Valor a 20°C
K _P	g P · m ⁻³	0,01
<i>Metanogénicas hidrogenotróficas</i>		
μ _{MH2}	d ⁻¹	0,55
b _{MH2}	d ⁻¹	0,11
K _{H2}	g DQO · m ⁻³	0,6
K _{O2}	g O ₂ · m ⁻³	0,2
K _{NH4}	g N · m ⁻³	0,05
K _P	g P · m ⁻³	0,01

Tabla A 9. Resultados de la calibración del modelo con respecto a la cámara de mezcla junto con los valores experimentales de octubre de 2018.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango salida CM		
SST (mg · L ⁻¹)	38.408	50.600
SSV (%)	83	74
DQO (mg DQO · L ⁻¹)	75.851	n.d.
DQO _s (mg DQO · L ⁻¹)	12.548	n.d.
AGV (mg DQO · L ⁻¹)	1.706	1.587
N-NH ₄ (mg N · L ⁻¹)	184	107
P-PO ₄ (mg P · L ⁻¹)	111	113
P _T (mg P · L ⁻¹)	639	699
pH	5,2	5,7
Alcalinidad (mg CaCO ₃ · L ⁻¹)	44	1.600

7.1.6. DESHIDRATACIÓN DE FANGO

Tabla A 10. Resultados de la calibración de la etapa de deshidratación junto con los valores experimentales de octubre de 2018.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango deshidratado		
SST (%)	25	n.d.
SSV (%)	71	n.d.
Producción SST (t/d)	1,97	n.d.
Producción SSV (t/d)	1,40	n.d.
Sobrenadante centrifugas (centrados)		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	68	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	640	640
DQO _s ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.773	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.002	839
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	33,0	56,6
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	25,6	24,4

7.2. VALIDACIÓN DEL MODELO BNRM2

7.2.1. DECANTACIÓN PRIMARIA

Tabla A 11. Valores de los parámetros de sedimentación de los decantadores primarios utilizados en la validación del modelo.

Parámetro	Valor Utilizado
IVF ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)	25
V_0 ($\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	409
$V_{S\text{max}}$ ($\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$)	310
r_h ($\text{m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,00019
r_p ($\text{m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,006
f_{ns}	0,4

Tabla A 12. Resultados de la calibración del modelo con respecto a los decantadores primarios junto con los valores experimentales de diciembre de 2019.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango purgado		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	183	182
SST ($\text{mg SST} \cdot \text{L}^{-1}$)	14.580	20.063
SSV (%)	84	81
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	22.495	23.300
DQO ₅ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.568	825
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	52,15	74,7
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	460	510
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	53,8	50,4
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	132	262,4
pH	6,5	6,7
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	193,0	298,5
Efluente		
SST ($\text{mg SST} \cdot \text{L}^{-1}$)	130	n.d.
SSV (%)	84	n.d.
Eliminación SST (%)	59	n.d.
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	389	n.d.
DQO ₅ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	201	n.d.
DBO ₅ ($\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$)	327	n.d.
DBO _{5,5} ($\text{mg DBO} \cdot \text{L}^{-1}$)	187	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	31,2	n.d.
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	35,0	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	2,5	n.d.
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	3,6	n.d.
pH	7,5	n.d.
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	285,0	n.d.

7.2.2. FANGOS ACTIVADOS

Tabla A 13. Resultados de la calibración del modelo con respecto al proceso biológico de la Línea de Aguas de la EDAR de Calahorra, diferenciando entre fango de purga y recirculación y efluente del reactor biológico, junto con los valores experimentales de diciembre de 2019.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Purga y Recirculación		
Caudal purga ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	315	353
Caudal recirculación externa ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	16.643	n.d.
Caudal recirculación interna ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	19.157	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.928	n.d.
SSV (%)	80	n.d.
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	5.671	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,4	n.d.
N-NO ₃ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,01	n.d.
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	316	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,8	n.d.
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	126	n.d.
Reactor biológico		
TRC (d)	25	25
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.720	4.375
SSV (%)	81	85
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.148	4910
DQO _s ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	14,7	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,1	2,2
N-NO ₃ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	5,1	n.d.
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	179	164
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,6	9,5

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
P_T (mg P·L ⁻¹)	69,5	143
OD cámara aerobia 1 (mg·L ⁻¹)	1	n.d.
OD cámara aerobia 2 (mg·L ⁻¹)	1	n.d.
OD cámara aerobia 3 (mg·L ⁻¹)	1	n.d.

7.2.3. ESPESADOR DE FANGO PRIMARIO

Tabla A 14. Valores de los parámetros de los espesadores de fango primario en la validación del modelo.

Parámetro	Valor Utilizado
IVF (mL·g ⁻¹)	27
V_0 (m·d ⁻¹)	402
V_{Smax} (m·d ⁻¹)	250
r_h (m ³ ·g ⁻¹)	0,000202
r_p (m ³ ·g ⁻¹)	0,0040
f_{ns}	0,00010

Tabla A 15. Resultados de la validación del modelo con respecto a los espesadores de fango primario junto con los valores experimentales de diciembre 2019.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango espesado		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	58	59
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	40.513	38.526
SSV (%)	82	82
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	65.118	34.350
DQO ₅ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	8.436	2.505
AGV ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	614	774
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	156	154
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.288	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	80,25	83,8
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	289	221
pH	6,3	6,1
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	155,1	256
Sobrenadante		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	124	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	583	575
SSV (%)	84	91
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.461	1.855
DQO ₅ ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.632	521
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	53,1	65
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	69,7	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	54,3	24,3
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	58,2	84,1
pH	6,5	7,2
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	188,6	n.d.

7.2.4. ESPESADOR DE FANGO SECUNDARIO

Tabla A 16. Resultados de la validación del modelo con respecto a los espesadores de fango secundario junto con los valores experimentales de diciembre 2019.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango espesado		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	28	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	54.000	54.164
SSV (%)	80	84
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	62.165	n.d.
DQO _s ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	15,6	n.d.
AGV ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,01	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,4	n.d.
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.462	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,8	n.d.
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.367	n.d.
pH	7,5	n.d.
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	203,3	n.d.
Sobrenadante		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	288	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	200	200
SSV (%)	80	n.d.
DQO _T ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	246	676
DQO _s ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	15,6	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,4	5,6
N _T ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	13,2	n.d.
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,8	2,8
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	6	21,3
pH	7,5	7,1
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	203,3	n.d.

7.2.5. CÁMARA DE MEZCLA

Tabla A 17. Valores de los parámetros estequiométricos correspondientes a los microorganismos de la cámara de mezcla utilizados en la validación del modelo.

Parámetro	Unidad	Valor
<i>Hidrólisis acidogénicas</i>		
f_{SI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,05
<i>Bacterias acidogénicas</i>		
Y_{ACID}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,15
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
f_{AC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,58
f_{PRO}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,25
<i>Bacterias acetogénicas</i>		
Y_{PRO}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,05
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
f_{AC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,57
<i>Metanogénicas acetotróficas</i>		
Y_{MAC}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,025
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20
<i>Metanogénicas hidrogenotróficas</i>		
Y_{MH2}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,045
f_{XI}	g DQO·g ⁻¹ DQO	0,20

Tabla A 18. Valores de los parámetros cinéticos correspondientes a los microorganismos de la cámara de mezcla utilizados en la validación del modelo.

Parámetro	Unidad	Valor a 20°C
<i>Hidrólisis acidogénicas</i>		
K_H	d^{-1}	43,0
K_X	$g\ DQO \cdot g^{-1}\ DQO$	150
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
<i>Bacterias acidogénicas</i>		
μ_{ACID}	d^{-1}	1,28
b_{ACID}	d^{-1}	0,33
K_F	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	15
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_A	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	6500
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P \cdot m^{-3}$	0,01
<i>Bacterias acetogénicas</i>		
μ_{PRO}	d^{-1}	0,18
b_{PRO}	d^{-1}	0,03
K_{PRO}	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	10
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_{H_2}	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	0,60
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05
K_P	$g\ P \cdot m^{-3}$	0,01
<i>Metanogénicas acetotróficas</i>		
μ_{MAC}	d^{-1}	0,11
b_{MAC}	d^{-1}	0,03
K_A	$g\ DQO \cdot m^{-3}$	30
K_{O_2}	$g\ O_2 \cdot m^{-3}$	0,20
K_{NH_4}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0,05

Parámetro	Unidad	Valor a 20°C
K _P	g P · m ⁻³	0,01
<i>Metanogénicas hidrogenotróficas</i>		
μ _{MH2}	d ⁻¹	0,55
b _{MH2}	d ⁻¹	0,11
K _{H2}	g DQO · m ⁻³	0,6
K _{O2}	g O ₂ · m ⁻³	0,2
K _{NH4}	g N · m ⁻³	0,05
K _P	g P · m ⁻³	0,01

Tabla A 19. Resultados de la validación del modelo con respecto a la cámara de mezcla junto con los valores experimentales de diciembre de 2019.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango salida CM		
SST (mg · L ⁻¹)	42.861	35.527
SSV (%)	82	82
DQO (mg DQO · L ⁻¹)	63.752	39.600
DQO _s (mg DQO · L ⁻¹)	8.049	1.695
AGV (mg DQO · L ⁻¹)	213	707
N-NH ₄ (mg N · L ⁻¹)	154	106
P-PO ₄ (mg P · L ⁻¹)	116	114
P _T (mg P · L ⁻¹)	637	552
pH	6,4	6,3
Alcalinidad (mg CaCO ₃ · L ⁻¹)	235,7	206

7.2.6. DESHIDRATACIÓN DE FANGO

Tabla A 20. Resultados de la validación de la etapa de deshidratación junto con los valores experimentales de diciembre de 2019.

Parámetro	Valor simulado	Valor experimental
Fango deshidratado		
SST (%)	16	16
SSV (%)	69	71
Producción SST (t/d)	2,3	n.d.
Producción SSV (t/d)	1,6	n.d.
Sobrenadante centrifugas (centrados)		
Caudal ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)	72	n.d.
SST ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	375	375
DQO _s ($\text{mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.497	n.d.
N-NH ₄ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$)	783	1.175
P _T ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	68,9	50,8
P-PO ₄ ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1}$)	47,4	48,4

7.3. CAUDALES MÁSICOS, CONCENTRACIONES Y RELACIONES MOLATES DE LOS ESCENARIOS SIMULADOS

7.3.1. ESCENARIO 0

Tabla A 21. Caudales másicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol a la corriente sobrenadante del espesador primario del Escenario 0.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	15,82	12,11	13,78	15,59	15,60	27,97
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	16,43	11,27	13,09	15,28	17,62	36,15
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	4,29	3,49	3,87	4,35	4,10	6,90
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	13,21	10,74	11,92	13,39	12,64	21,24
K sol. (kg·d ⁻¹)	10,58	8,03	9,52	11,10	11,60	21,61

Tabla A 22. Caudales másicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol a la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido del Escenario 0.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	3,91	4,98	4,35	3,71	3,99	0,80
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	47,74	52,32	50,79	48,54	47,35	13,37
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	1,08	1,36	1,23	1,06	1,15	0,31
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	6,27	7,87	7,11	6,15	6,65	1,78
K sol. (kg·d ⁻¹)	27,09	30,10	28,43	26,50	26,49	7,27

Tabla A 23. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante del espesador primario y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 0.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	19,73	17,09	18,12	19,30	19,58	28,76
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	64,17	63,59	63,88	63,83	64,97	49,52
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	5,37	4,85	5,10	5,41	5,25	7,21
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	19,47	18,61	19,02	19,54	19,28	23,02
K sol. (kg·d ⁻¹)	37,67	38,13	37,95	37,60	38,09	28,87

Tabla A 24. Concentraciones de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante del espesador primario y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 0.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6
P-PO ₄ (mg·L ⁻¹)	101,28	87,78	93,06	99,09	100,48	140,46
N-NH ₄ (mg·L ⁻¹)	329,46	326,59	328,01	327,60	333,41	241,80
Mg sol. (mg·L ⁻¹)	27,57	24,89	26,17	27,76	26,94	35,19
Ca sol. (mg·L ⁻¹)	99,97	95,59	97,68	100,28	98,94	112,41
K sol. (mg·L ⁻¹)	193,41	195,86	194,88	192,98	195,47	141,00

Tabla A 25. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P de la corriente sobrenadante del espesador primario del Escenario 0.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6
mol Ca·mol ⁻¹ P	0,65	0,69	0,67	0,66	0,63	0,59
mol N·mol ⁻¹ P	2,30	2,06	2,10	2,17	2,50	2,86
mol Mg·mol ⁻¹ P ⁻¹	0,35	0,37	0,36	0,36	0,34	0,31

Tabla A 26. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P de la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido del Escenario 0.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6
mol Ca·mol ⁻¹ P	1,24	1,22	1,26	1,28	1,29	1,72
mol N·mol ⁻¹ P	27,03	23,23	25,84	28,92	26,27	36,99
mol Mg·mol ⁻¹ P	0,35	0,35	0,36	0,36	0,37	0,49

Tabla A 27. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante del espesador primario y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 0.

Parámetros	S1	S2	S3	S4	S5	S6
mol Ca·mol ⁻¹ P	0,76	0,84	0,81	0,78	0,76	0,62
mol N·mol ⁻¹ P	7,19	8,23	7,79	7,31	7,34	3,81
mol Mg·mol ⁻¹ P	0,35	0,36	0,36	0,36	0,34	0,32

7.3.2. ESCENARIO 1

Tabla A 28. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol a la corriente sobrenadante de la centrifuga del Escenario 1.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	0,35	0,54	0,61	0,70
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	0,68	1,08	1,22	1,41
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	0,15	0,23	0,26	0,30
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	0,46	0,72	0,80	0,93
K sol. (kg·d ⁻¹)	0,73	1,14	1,28	1,48

Tabla A 29. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol a la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido del Escenario 1.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	5,69	5,50	5,41	5,25
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	50,60	50,06	49,91	49,69
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	0,88	0,85	0,84	0,83
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	5,09	4,92	4,87	4,78
K sol. (kg·d ⁻¹)	27,34	26,85	26,68	26,44

Tabla A 30. Caudales másicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante de la centrifuga y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 1.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	6,04	6,04	6,02	5,96
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	51,28	51,14	51,12	51,10
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	1,03	1,08	1,10	1,13
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	5,55	5,64	5,67	5,71
K sol. (kg·d ⁻¹)	28,07	27,99	27,96	27,92

Tabla A 31. Concentraciones de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante de la centrifuga y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 1.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (mg·L ⁻¹)	85,72	85,73	85,36	84,54
N-NH ₄ (mg·L ⁻¹)	727,65	725,73	725,45	725,24
Mg sol. (mg·L ⁻¹)	14,59	15,36	15,62	15,99
Ca sol. (mg·L ⁻¹)	78,76	80,03	80,45	81,05
K sol. (mg·L ⁻¹)	398,28	397,18	396,80	396,23

Tabla A 32. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P de la corriente sobrenadante de la centrifuga del Escenario 1.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	1,03	1,02	1,02	1,02
mol N·mol P ⁻¹	4,34	4,41	4,42	4,45
mol Mg·mol P ⁻¹	0,55	0,55	0,55	0,55

Tabla A 33. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P de la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido del Escenario 1.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	0,69	0,69	0,70	0,70
mol N·mol P ⁻¹	19,65	20,13	20,41	20,91
mol Mg·mol P ⁻¹	0,20	0,20	0,20	0,20

Tabla A 34. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante de la centrifuga y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 1.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	0,71	0,72	0,73	0,74
mol N·mol P ⁻¹	18,77	18,72	18,79	18,97
mol Mg·mol P ⁻¹	0,22	0,23	0,23	0,24

7.3.3. ESCENARIO 2

Tabla A 35. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol a la corriente sobrenadante del espesador primario del Escenario 2.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	27,69	25,30	25,23	16,60
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	47,43	38,79	39,45	18,90
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	5,82	5,74	5,66	4,35
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	17,91	17,68	17,42	13,39
K sol. (kg·d ⁻¹)	30,81	25,62	26,24	12,17

Tabla A 36. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol a la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido del Escenario 2.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	0,99	1,69	1,83	3,63
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	26,13	31,28	31,13	46,26
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	0,56	0,59	0,62	1,06
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	3,25	3,39	3,56	6,15
K sol. (kg·d ⁻¹)	9,83	13,89	13,59	25,82

Tabla A 37. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante del espesador primario y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 2.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	28,68	27,00	27,06	20,23
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	73,56	70,07	70,58	65,16
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	6,38	6,33	6,27	5,41
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	21,16	21,07	20,99	19,53
K sol. (kg·d ⁻¹)	40,64	39,51	39,83	37,99

Tabla A 38. Concentraciones de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante del espesador primario y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 2.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (mg·L ⁻¹)	146,71	138,13	138,43	103,87
N-NH ₄ (mg·L ⁻¹)	376,25	358,52	361,02	334,54
Mg sol. (mg·L ⁻¹)	32,61	32,37	32,09	27,77
Ca sol. (mg·L ⁻¹)	108,20	107,81	107,35	100,29
K sol. (mg·L ⁻¹)	207,88	202,17	203,74	195,05

Tabla A 39. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P de la corriente sobrenadante del espesador primario del Escenario 2.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	0,50	0,54	0,53	0,62
mol N·mol P ⁻¹	3,79	3,39	3,46	2,52
mol Mg·mol P ⁻¹	0,27	0,29	0,29	0,33

Tabla A 40. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P de la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido del Escenario 2.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	2,54	1,55	1,51	1,31
mol N·mol P ⁻¹	58,37	40,91	37,62	28,20
mol Mg·mol P ⁻¹	0,72	0,44	0,43	0,37

Tabla A 41. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante del espesador primario y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 2.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	0,57	0,60	0,60	0,75
mol N·mol P ⁻¹	5,67	5,74	5,77	7,12
mol Mg·mol P ⁻¹	0,28	0,30	0,30	0,34

7.3.4. ESCENARIO 3

Tabla A 42. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol a la corriente sobrenadante de la centrifuga del Escenario 3.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	0,77	0,95	1,01	2,35
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	3,06	3,80	4,05	9,65
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	0,25	0,31	0,33	0,75
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	0,76	0,95	1,01	2,31
K sol. (kg·d ⁻¹)	2,68	3,32	3,53	8,15

Tabla A 43. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol a la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido del Escenario 3.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO ₄ (kg·d ⁻¹)	5,05	4,29	4,81	3,32
N-NH ₄ (kg·d ⁻¹)	48,41	47,56	47,44	40,92
Mg sol. (kg·d ⁻¹)	0,85	0,82	0,82	0,67
Ca sol. (kg·d ⁻¹)	4,90	4,77	4,74	3,88
K sol. (kg·d ⁻¹)	25,83	25,18	25,01	20,54

Tabla A 44. Caudales máxicos de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante de la centrífuga y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 3.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO₄ (kg·d⁻¹)	5,80	5,24	5,80	5,30
N-NH₄ (kg·d⁻¹)	51,47	51,36	51,49	52,50
Mg sol. (kg·d⁻¹)	1,09	1,13	1,14	1,26
Ca sol. (kg·d⁻¹)	5,66	5,72	5,74	5,92
K sol. (kg·d⁻¹)	28,52	28,50	28,54	28,60

Tabla A 45. Concentraciones de los componentes P-PO₄, N-NH₄, Mg sol, Ca sol y K sol en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante de la centrífuga y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 3.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
P-PO₄ (mg·L)	82,21	74,37	82,16	75,17
N-NH₄ (mg·L)	729,53	728,92	729,97	744,89
Mg sol. (mg·L)	15,50	16,04	16,22	17,81
Ca sol. (mg·L)	80,25	81,14	81,43	84,03
K sol. (mg·L)	404,19	404,49	404,59	405,79

Tabla A 46. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P de la corriente sobrenadante de la centrifuga del Escenario 3.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	0,77	0,77	0,77	0,77
mol N·mol P ⁻¹	8,84	8,86	8,87	5,95
mol Mg·mol P ⁻¹	0,41	0,41	0,41	0,41

Tabla A 47. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P de la corriente sobrenadante del deshidratador de fango digerido del Escenario 3.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	0,75	0,86	0,76	0,90
mol N·mol P ⁻¹	21,18	24,50	21,83	27,26
mol Mg·mol P ⁻¹	0,21	0,24	0,22	0,26

Tabla A 48. Ratios molares Ca/P, N/P y Mg/P en la corriente resultante de la mezcla del sobrenadante de la centrifuga y del sobrenadante del deshidratador de fango digerido correspondientes al Escenario 3.

Parámetros	S1	S2	S3	S4
mol Ca·mol P ⁻¹	0,75	0,84	0,76	0,86
mol N·mol P ⁻¹	19,56	21,67	19,58	21,91
mol Mg·mol P ⁻¹	0,24	0,27	0,25	0,30

7.4. FICHA TÉCNICA ENZIMAS HIDROLÍTICAS

7.4.1. ENZIMAS FITASA (CASA COMERCIAL ASA ENZYME)

Special Enzymes
Product Information



Phytase

6-Phytase, EC 3.1.3.26

Description: enzyme for hydrolysis of phytic acid under release of phosphate

Origin: from genetically engineered *E.coli*

Effect: generate phosphate from vegetable sources

Application: feed additive for monogastric animals (non-ruminant), reduced feed-ing of phosphate

Advantages of bacterial phytase in comparison with fungal phytase:

- low inhibition by phosphate
- optimum of reaction within acidic range
- higher stability of temperature
- resistant against proteolytic activities
- cheap production
- low K_M -value
- high specific activity

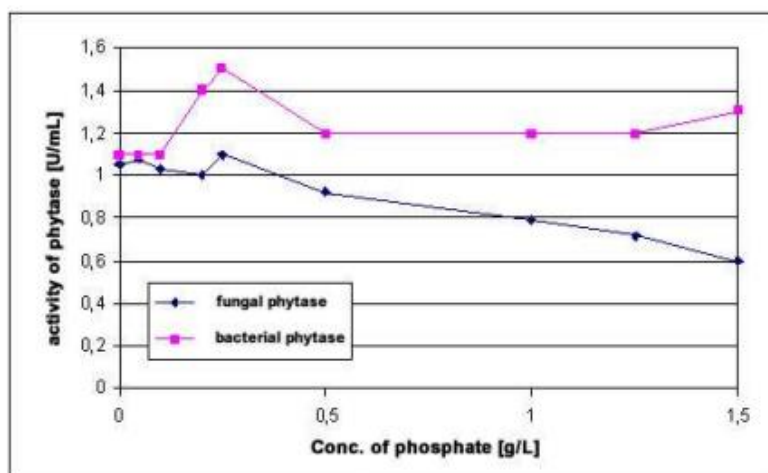


Fig.1: Dependence of phytase activity from the concentration of phosphate

Parameter of reaction:

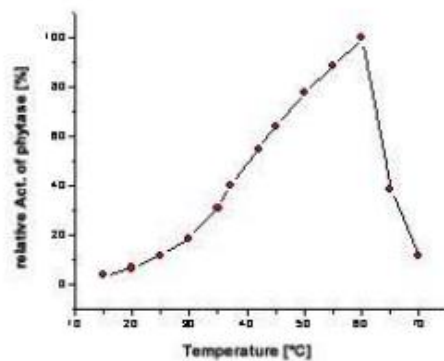


Fig.2: Dependence of phytase activity from temperature

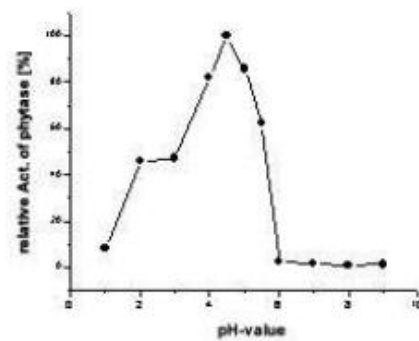


Fig.3: Dependence of phytase activity from pH-value

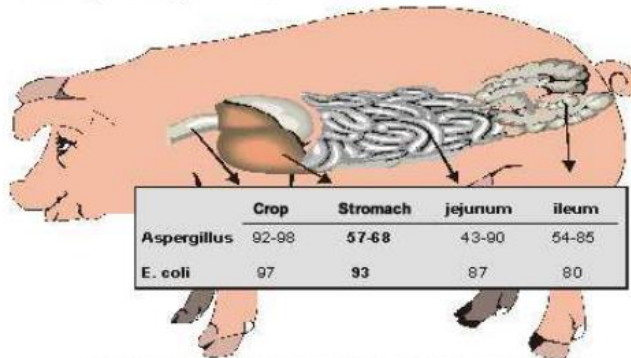
Behaviour during pelletizing :

The behaviour during the pelletizing process is an essential matter for the technical processing. The bacterial phytase remains still 99% of activity in contrast fungal phytases may lose up to 70 % of activity (dependence of origin).

origin of phytase	activity before pelletizing [%]	activity after pelletizing [%]	
		60° C	70° C
<i>Aspergillus A</i>	100	92,6	70,5
<i>Aspergillus R</i>	100	84,0	62,3
<i>Peniophora</i>	100	26,8	15,7
<i>Aspergillus T</i>	100	51,9	25,0
<i>E. coli</i>	100	98,8	78,0

Tab.1: Influence of pelletizing on phytase activity

Rest activity after incubation (60min at 40°C) in supernatant from liquits of several parts of digestic tract:



modified, from: Archives of Animal Nutrition, 53 (2000) 353 373 .

Activity: > 60 U/ml (method: ASA Spezialenzyme GmbH)

Order-No.: 1600

Form of delivery: light brown, frozen liquid

Storage: at -20°C

Literature: 1. Sophia Kleist, dissertation, university of Bielefeld 2003
2. see our homepage <www.asa-enzyme.de> phytase article and phytase flyer under F&E, Projekte (only in German language)

ASA Spezialenzyme GmbH
Am Exer 19 C
38302 Wolfenbüttel
Germany

phone: +49 (0)5331 8825-30
fax: +49 (0)5331 8825-32

e-mail: service@asa-enzyme.de
www.asa-enzyme.com
page 3 / 3
date: 06/2015

7.4.2. ENZIMAS CELULOLÍTICAS (CASA COMERCIAL SIGMA ALDRICH - MERK)

SIGMA-ALDRICH®sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:

Viscozyme® L - cellulolytic enzyme mixture

Product Number:

V2010

MDL:

MFCD03101941

Storage Temperature:

2 - 8 °C

TEST**Specification**

Enzymatic Activity

≥ 100

FBGU/G

Betaglucanase units

Density

1.10 - 1.30 g/ml

Note

Viscozyme is a registered trademark of Novozymes Corp.

Specification: PRD.0.ZQ5.10000042170

7.5. ABREVIATURAS

GENERAL

EDAR: estación depuradora de aguas residuales

EBNR: eliminación biológica de nutrientes

EBPR: eliminación biológica de P

P fósforo

N: nitrógeno

P_T: fósforo total

N_T: nitrógeno total

P-PO₄: ortofosfato

N-NH₄: amonio

Mg: magnesio

K: potasio

Ca: Calcio

Ca/Mg Relación molar calcio/magnesio en la solución influente al reactor

Ca/P Relación molar calcio/fósforo en la solución influente al reactor

Mg/P Relación molar magnesio/ fósforo en la solución influente al reactor

N/P Relación molar nitrógeno/ fósforo en la solución influente al reactor

NaOH: hidróxido de sodio

MgCl₂: cloruro de magnesio

ST: sólidos totales

SV: sólidos volátiles

SST Sólidos suspendidos totales

SSV Sólidos suspendidos volátiles

AGV: ácidos grasos volátiles

Alk: alcalinidad

DQO_T: demanda química de oxígeno total

DQO_S: demanda química de oxígeno soluble

DBO₅: demanda biológica de oxígeno total a 5 días

DBO_{5,S}: demanda biológica de oxígeno soluble a 5 días

TRH tiempo de retención hidráulico

TRC: tiempo de retención celular

OD: oxígeno disuelto

P_{org disponible}: concentración de fósforo orgánico disponible en el sustrato

ΔPO_{4 ENZIMA}: liberación neta de ortofosfato por efecto de la adición de enzimas

Eficacia (%): eficacia de liberación de ortofosfato por efecto de la adición de enzimas

P_{phytasa} fósforo disponible en forma de ácido fítico en la disolución patrón de ácido fítico

%P_{org hidrolizado}: grado de hidrólisis del sustrato

CS: citosano

TEOS: tetraetil ortosilicato

APTES: 3-aminopropiltriethoxisilano

PAAm: poliacramida

PAO: bacterias acumuladoras de polifosfatos

PHA: polihidroxialcanoatos

Poly-P: polifosfato

MODELO BNRM2

PARÁMETROS SEDIMENTACIÓN DEL FANGO:

IVF: índice volumétrico del fango

V_O ($m \cdot h^{-1}$): Máxima velocidad de sedimentación zonal.

V_{Smax} ($m \cdot h^{-1}$): Máxima velocidad de sedimentación efectiva.

r_h ($m^3 \cdot g^{-1}$): Parámetro característico de la sedimentación zonal.

r_p ($m^3 \cdot g^{-1}$): Parámetro característico de la sedimentación floculada.

f_{ns} : Fracción no sedimentable de los sólidos en la entrada.

COMPONENTES DEL MODELO:

COMPONENTES SOLUBLES:

S_A ($M_{DQO} L^{-3}$): Acetato.

S_{ALK} ($M_{HCO_3} L^{-3}$): alcalinidad del agua residual.

S_F ($M_{DQO} L^{-3}$): sustrato fermentable soluble y fácilmente biodegradable.

S_I ($M_{DQO} L^{-3}$): materia orgánica soluble inerte.

S_{N_2} ($M_N L^{-3}$): nitrógeno gaseoso, N_2 .

S_{NH_4} ($M_N L^{-3}$): nitrógeno amoniacal.

S_{NO_3} ($M_N L^{-3}$): nitrógeno oxidado, nitrato más nitrito.

S_{O_2} ($M_{O_2} L^{-3}$): oxígeno disuelto.

S_{PO_4} ($M_P L^{-3}$): fósforo soluble inorgánico, principalmente ortofosfatos.

S_{PRO} ($M_{DQO} L^{-3}$): Ácidos grasos de cadena corta excepto el acético.

S_{H_2} ($M_{DQO} L^{-3}$): hidrógeno gaseoso, H_2 .

S_{CH_4} ($M_{DQO} L^{-3}$): metano, CH_4 .

S_{Cl} ($M_C L^{-3}$): carbono inorgánico, ($CO_3 + HCO_3 + CO_2$).

S_H ($M_H L^{-3}$): protones.

COMPONENTES SUSPENDIDOS:

X_{ACID} ($M_{DQO} L^{-3}$): organismos heterótrofos acidogénicos.

X_{ACET} ($M_{DQO}L^{-3}$): organismos heterótrofos acetogénicos.

X_{AUT} ($M_{DQO}L^{-3}$): organismos autótrofos nitrificantes.

X_H ($M_{DQO}L^{-3}$): organismos heterótrofos.

X_I ($M_{DQO}L^{-3}$): materia orgánica inerte suspendida.

X_{MAC} ($M_{DQO}L^{-3}$): organismos heterótrofos metanogénicos acetotróficos.

X_{MH2} ($M_{DQO}L^{-3}$): organismos autótrofos metanogénicos hidrogenotróficos.

X_{NV} ($M_{SST}L^{-3}$): sólidos suspendidos no volátiles (SSNV).

X_{PAO} ($M_{DQO}L^{-3}$): organismos acumuladores de polifosfatos (PAO).

X_{PHA} ($M_{DQO}L^{-3}$): producto almacenado intracelularmente en los organismos acumuladores de polifosfatos.

X_{PP} ($M_P L^{-3}$): polifosfato, almacenado intracelularmente en las bacterias PAO.

X_S ($M_{DQO}L^{-3}$): sustrato lentamente biodegradable.

X_{SST} ($M_{SST}L^{-3}$): sólidos suspendidos totales (SST).

COEFICIENTES ESTEQUIOMÉTRICOS

i_{NSI} : contenido en nitrógeno de S_I

i_{NSF} : contenido en nitrógeno de S_F

i_{NXI} : contenido en nitrógeno de X_I

i_{NXS} : contenido en nitrógeno de X_S

i_{NBM} : contenido en nitrógeno de la biomasa

i_{PSI} : contenido en fósforo de S_I

i_{PSF} : contenido en fósforo de S_F

i_{PXI} : contenido en fósforo de X_I

i_{PXS} : contenido en fósforo de X_S

i_{PBM} : contenido en fósforo de la biomasa

i_{SSTXI} : contenido en sólidos suspendidos de X_I

i_{SSTXS} : contenido en sólidos suspendidos de X_S

i_{SSTBM} : contenido en sólidos suspendidos de la biomasa

PARÁMETROS CINÉTICOS Y ESTEQUIOMÉTRICOS

K_H : constante de hidrólisis

K_S : constante de semi-saturación

K_I : constante de inhibición

K_X : constante de partición de sustrato sobre biomasa

K_F : constante de semi-saturación para sustrato fácilmente biodegradable

K_{O_2} : constante de inhibición por oxígeno disuelto

K_{H_2} : constante de inhibición o afinidad al hidrógeno

K_A : constante de inhibición o saturación por acetato

K_{NH_4} : constante de limitación por amonio

K_P : constante de limitación por fósforo

K_{PRO} : constante de saturación para el propiónico

f_{SI} : fracción de materia inerte

f_{XI} : fracción de biomasa inerte particulada

f_{AC} : fracción de que se convierte en acetato

f_{PRO} : fracción que se convierte en propiónico

f_{H_2} : fracción que se convierte en hidrógeno

Y_H : rendimiento de crecimiento de bacterias heterótrofas

Y_{ACID} : rendimiento de crecimiento de las acidogénicas

Y_{PRO} : rendimiento de crecimiento de

Y_{MAC} : rendimiento de crecimiento de metanogénicas acetoclásticas

Y_{MH_2} : rendimiento de crecimiento de metanogénicas hidrogenotróficas

η_{NO_3} : factor de reducción de velocidad de crecimiento en condiciones anóxicas

μ_H : velocidad máxima de crecimiento de las heterótrofas

μ_{ACID} : velocidad máxima de crecimiento de acidogénicas

μ_{PRO} : velocidad máxima de crecimiento de acetogénicas

μ_{MAC} : velocidad máxima de crecimiento de metanogénicas acetoclásticas

μ_{MH2} : velocidad máxima de crecimiento de metanogénicas hidrogenotróficas

b_{ACID} : tasa de lisis de bacterias acidogénicas

b_{PRO} : tasa de lisis de bacterias acetogénicas

b_{MAC} : tasa de lisis de metanogénicas acetoclásticas

b_{MH2} : tasa de lisis de metanogénicas hidrogenotróficas

PARÁMETROS SIMULACIONES

Q_{elut} : caudal de elutriación

Q_{dig} : caudal a digestión

X_{PP} Salida CM: cantidad de Poly-P a la salida de la cámara de mezcla

$Q_{Sob. Esp. 1^\circ}$: caudal del sobrenadante del espesador primario

$P-PO_4$ Sob. Esp. 1° : concentración de $P-PO_4$ presente en el sobrenadante del espesador primario

$P-PO_4$ recup Sob. Esp. 1° : cantidad de $P-PO_4$ recuperado en el sobrenadante del espesador primario

h : espesor del manto de fangos del espesador primario

$SST_{Sob. Esp. 1^\circ}$: concentración de sólidos suspendidos en el sobrenadante del espesador primario

$SST_{Dig. An}$: concentración de sólidos suspendidos en el fango espesado que va a digestión

$Q_{biogás}$: caudal de biogás generado en el proceso de digestión anaerobia

$Q_{Sob. Desh}$: caudal del sobrenadante del deshidratador de fango digerido

$P-PO_4$ Sob. Desh: concentración de $P-PO_4$ presente en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido

$P-PO_4$ recup Sob. Desh: cantidad de $P-PO_4$ recuperado en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido

$SST_{Fango Centr}$: concentración de SST en el fango a la salida de la centrífuga

Q_{centr} : caudal a centrífuga

$Q_{Sob Centr}$: caudal del sobrenadante de la centrífuga

$P-PO_4$ Sob. Centr: concentración de $P-PO_4$ presente en el sobrenadante de la centrífuga

$P-PO_4$ recup. Sob. Centr: cantidad de $P-PO_4$ recuperado en el sobrenadante de la centrífuga

$Q_{\text{Sob. Desh}}$: caudal del sobrenadante del deshidratador de fango digerido

$P\text{-PO}_4 \text{ Sob. Desh}$: concentración de $P\text{-PO}_4$ presente en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido

$P\text{-PO}_4 \text{ recup. Sob. Desh}$: cantidad de $P\text{-PO}_4$ recuperado en el sobrenadante del deshidratador de fango digerido
