



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Departamento de Ingeniería Química

Comportamiento dinámico de digestores anaerobios

Memoria presentada por
Francisco José Molina Pérez
Para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Diciembre de 2007

Título:

Comportamiento Dinámico de Digestores Anaeróbios

Serie:

Tesis Doctorales.

Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos

Reservados todos los derechos, esta prohibido, bajo sanciones penales y el resarcimiento civil previsto en las leyes, reproducir, registrar o transmitir esta publicación, íntegra o parcialmente por cualquier sistema de recuperación y por cualquier medio, sea mecánico, electrónico, magnético, electroóptico, por fotocopia o por cualquier otro, sin la autorización previa por escrito del autor.

© Francisco José Molina Pérez, 2007
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Santiago de Compostela

Imprime: LAPICES 4
Avda. da Coruña, 4
15706 Santiago de Compostela
España

Depósito Legal: C 449-2008
ISBN-10: 84-612-1689-5
ISBN-13: 978-84-612-1689-5
Impreso en España



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Departamento de Ingeniería Química

Juan Manuel Lema Rodicio, Catedrático de Ingeniería Química y Enrique Roca Bordello, Catedrático de Ingeniería Química, ambos de la Universidad de Santiago de Compostela,

Informan:

Que la memoria titulada "Comportamiento dinámico de digestores anaerobios" que, para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química, Programa de Doctorado en Ingeniería Química y Ambiental, presenta Don Francisco José Molina Pérez, ha sido realizada bajo nuestra inmediata dirección en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman el presente informe en Santiago de Compostela, septiembre de 2007.

Juan M. Lema Rodicio

Enrique Roca Bordello

Esta Tesis fue presentada el día 17 de diciembre de 2007 en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de la Universidad de Santiago de Compostela ante el siguiente tribunal:

Presidente

Dr. Jaime Luís García de las Heras

Departamento de Ingeniería Ambiental

Centro de Estudios e Investigaciones de Guipúzcoa (CEIT)

Secretaria

Dra. Anuska Mosquera Corral

Departamento de Ingeniería Química

Universidad de Santiago de Compostela

Vocales

Dr. Jon Iza López

Departamento de Ingeniería Química

Universidad de Bilbao

Dra. Maria Madalena dos Santos Alves

Departamento de Ingeniería Biológica

Universidade do Minho (Portugal)

Dr. Eugenio Fernández Carrasco

Departamento de Ingeniería Química

Universidad de Santiago de Compostela

Obtuvo la calificación de ***Sobresaliente Cum Laude***



AGRADECIMIENTOS

Estos cuatro años de aventura en España han sido maravillosos para todos los miembros de mi familia. Hemos conocido muchísimas personas buenas, amables y solidarias; con las que compartimos momentos de alegría y también de dificultades, palpando y sintiendo esta realidad que es Galicia y España.

En primer lugar quiero agradecer la amistad, orientación y apoyo de mis directores Juan Lema y Enrique Roca, quienes con paciencia y confianza me guiaron en el camino a veces tortuoso de una tesis doctoral. Me llevo muchas experiencias y aprendizajes de este camino, especialmente del principio aplicado de mejoramiento continuo.

Este trabajo es el resultado del esfuerzo de muchas personas. Quiero reconocer la amistad de Gonzalo y sus orientaciones para enfrentar la herencia de la planta piloto y sus caprichos; a Carlos por su ayuda y compañía durante los innumerables problemas, fallos y dificultades de la experimentación. A Laura, Miguel, Daniela, Elisabeth y Dafne mil gracias por la paciencia y ayuda con los largos ensayos de actividades y la operación de reactores de laboratorio y planta piloto. A Mar y Miriam gracias por vuestro buen humor y por analizar las "mil muestras" generadas en la experimentación. María que hubiera hecho sin ti en los análisis estadísticos, mil gracias. A Magda le agradezco su ayuda con los reactivos y los debates y conversaciones al mediodía en el instituto. Thelmo y Amaya gracias por compartir el despacho y por las oportunas ayudas ante las dificultades. A Mónica, gracias por compartir tus conocimientos de la técnica de FISH y a José en los últimos tiempos por tu apoyo en el análisis de los gránulos. Mi reconocimiento a Rosa por su diligencia en los trámites y su ayuda para buscar solución a los problemas; lo mismo que a José Manuel en la planta piloto por su compañía y colaboración en el arreglo de averías.

Deseo reconocer la amistad, el apoyo y el buen ambiente que he vivido en el grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos de la USC, los momentos de trabajo pero también de charla y de compartir, los ruidosos cafés y las deliciosas cenas.

Especial agradecimiento y amistad tengo con la familia chilena de Paola y Julio, así como con nuestro compatriota Juan Carlos; ellos nos recibieron y acogieron desde el primer día. Vuestra ayuda fue fundamental para organizar nuestra estadía en España.

A mi esposa Dora, compañera de esta aventura y muchas más; a mis hijos Santiago, Andrés y Juliana. Gracias por el amor y el cariño durante estos años, sin vuestro apoyo día a día no habría logrado finalizar esta empresa. A mis padres, gracias por vuestro ejemplo de vida. A toda la familia en Colombia y en España, mil gracias por acompañarnos y ayudarnos a resolver las dificultades que se presentan cuando uno esta lejos de su tierra.

Mi familia y yo, tenemos la fortuna de contar con muchísimas amistades en Santiago y especialmente en los Tilos, nuestro barrio. Hemos sentido que Galicia realmente es comunidad de acogida, nos han abierto las puertas a la amistad y al compartir. Como olvidar las maravillosas veladas en el parque celebrando un cumpleaños o la noche de San Juan con las hogueras. Las reuniones del "sindicato femenino" bajo los castaños. Las caminatas por los bosques y aldeas cercanas con nuestros amigos caminantes. El bullicio de la hora de entrada de los niños al cole. Los amigos de la parroquia siempre dispuestos a apoyarnos y el aperitivo en el hotel. Mil gracias a todos, los nombres y rostros de todos vosotros los llevamos en el corazón.

La financiación de esta tesis y de la estadía con mi familia durante estos años ha sido posible gracias a diversos apoyos. Gracias a la Universidad de Santiago de Compostela y al grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos por otorgarme la bolsa predoctoral para estudiantes iberoamericanos durante dos años. El proyecto europeo TELEMAC y el proyecto ANACOM (CTQ2004-07811-C02-01) financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia español (con apoyo europeo FEDER incluido), también contribuyeron de forma decisiva a la realización de este trabajo.

A mi querida Universidad de Antioquia y a su Facultad de Ingeniería, les debo especial agradecimiento por concederme la comisión de estudios durante cuatro años. Reconozco que he sido muy afortunado y privilegiado. Regreso a Colombia y a Medellín con todas las ganas de trabajar y aportar mis energías a la construcción del sueño de una Colombia más justa y pacífica.

Santiago de Compostela, septiembre de 2007

“Sen sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.

Mas, se você tiver grandes sonhos.....

seus erros produzirão crescimento,

seus desafios produzirão oportunidades,

seus medos produzirão coragem.

Por isso nunca desista dos seus sonhos”

Augusto Cury

A mi compañera Dora y a nuestros hijos:

Santiago, Andrés y Juliana

Índice

Resumen	
Capítulo 1. Introducción general	1-1
Resumen	1-1
1.1 Digestión anaerobia	1-3
1.1.1 Aplicación, ventajas y limitaciones	1-3
1.1.2 Monitorización, diagnóstico y control	1-4
1.2 Ecología Microbiana de la digestión anaerobia	1-9
1.2.1 Microbiología	1-9
1.2.2 Características de la biomasa granular anaerobia	1-10
1.3 Estructura de la tesis	1-12
1.4 Referencias	1-13
Capítulo 2. Materiales y métodos	2-1
Resumen	2-1
2.1 Métodos analíticos	2-3
2.1.1 Fase líquida	2-3
2.1.2 Fase gas	2-8
2.1.3 Fase sólida	2-9
2.2 Aguas sintéticas	2-18
2.3 Planta Piloto Anaerobia	2-20
2.3.1 Reactor	2-20
2.3.2 Línea de agua	2-22
2.3.3 Línea de gas	2-23
2.3.4 Línea de información	2-24
2.3.5 Software de monitorización	2-26
2.3.6 Analizadores <i>on-line</i> y equipos auxiliares	2-27
2.4 Referencias	2-31

Capítulo 3. Validación de un sistema automático de monitorización de alcalinidad y ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios	3-1
Resumen	3-1
3.1 Introducción	3-3
3.1.1 Importancia de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles en la operación de reactores anaerobios	3-3
3.1.2 Curva de valoración y capacidad tampón	3-4
3.1.3 Estado del arte de la determinación <i>on-line</i> de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles	3-7
3.2 Materiales y métodos	3-10
3.2.1 Descripción del analizador ANASENSE®	3-10
3.2.2 Metodologías utilizadas en la determinación <i>on-line</i> de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles	3-11
3.2.3 Montajes experimentales para la validación del ANASENSE®	3-15
3.2.4 Protocolos de validación	3-19
3.2.5 Métodos de valoración y análisis químico	3-20
3.2.6 Regresión lineal simple	3-21
3.3 Resultados y discusión	3-24
3.3.1 Validación en planta piloto	3-24
3.3.2 Validación en planta industrial	3-34
3.4 Conclusiones y recomendaciones	3-42
3.4.1 Conclusiones	3-42
3.4.2 Recomendaciones	3-43
3.5 Referencias	3-44

Capítulo 4. Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones	4-1
Resumen	4-1
4.1 Introducción	4-3
4.1.1 Detección de estados estacionarios	4-4
4.1.2 Selección del número mínimo de variables para clasificar estados estacionarios	4-8
4.1.3 Análisis dinámico de digestores anaerobios	4-10
4.2 Materiales y métodos	4-17
4.2.1 Equipo experimental y aguas residuales tipo	4-17
4.2.2 Protocolo de experimentación	4-17
4.2.3 Variables estudiadas	4-20
4.2.4 Metodología de determinación del número mínimo de variables para clasificar estados estacionarios	4-21
4.2.5 Metodología de selección de variables para la identificación de sobrecargas orgánicas	4-22
4.3 Resultados y discusión	4-24
4.3.1 Selección de variables en estados estacionarios	4-24
4.3.2 Determinación del número mínimo de variables para la identificación de diferentes estados estacionarios	4-27
4.3.3 Selección de variables en estados dinámicos	4-35
4.3.4 Análisis conjunto	4-53
4.4 Conclusiones	4-55
4.5 Referencias	4-57

Capítulo 5. Evolución de la ecología microbiana y características técnicas de gránulos anaerobios sometidos a diferentes aguas residuales	5-1
Resumen	5-1
5.1 Introducción	5-3
5.1.1 Estructura de la biomasa granular	5-3
5.1.2 Características físicas	5-5
5.1.3 Composición química	5-8
5.1.4 Composición microbiológica	5-9
5.1.5 Actividad	5-10
5.2 Materiales y métodos	5-12
5.2.1 Equipos experimentales	5-12
5.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	5-15
5.2.3 Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization (FISH)	5-15
5.3 Resultados y discusión	5-23
5.3.1 Evolución de la biomasa en reactores de laboratorio	5-23
5.3.2 Evolución de la biomas en planta piloto	5-43
5.4 Conclusiones	5-54
5.6 Referencias	5-56
Conclusiones generales	C-1

Resumen

La aplicación de la digestión anaerobia en el tratamiento de aguas residuales tanto industriales como municipales es una tecnología actualmente en proceso de expansión, que día a día es más aplicada a la solución de problemas específicos de control de la contaminación del agua. Sin embargo la monitorización avanzada, la diagnosis y el control de dicho proceso no están consolidados y se requiere de mayor investigación orientada a robustecer el proceso frente a perturbaciones y desestabilizaciones.

En el capítulo 1 se aporta una visión sobre el contexto en el que se desarrolló la tesis, introduciendo algunos conceptos básicos sobre la aplicación, ventajas y limitaciones de la digestión anaerobia; identificando la monitorización, diagnosis y control del proceso como actividades claves en la aplicación exitosa de esta tecnología de depuración de aguas residuales. Se presentan además algunos aspectos básicos de la microbiología del proceso, así como los fundamentos de ecología microbiana y características técnicas de la biomasa granular utilizada usualmente en este tipo de proceso.

En el capítulo 2 se presentan los métodos analíticos y materiales utilizados transversalmente en el desarrollo del trabajo experimental. Los métodos analíticos se agrupan de acuerdo con la fase a que pertenecen: fase líquida, sólida o gaseosa. En el apartado de materiales se consigna la composición de las aguas residuales sintéticas y la descripción de la planta piloto anaerobia utilizada en la experimentación. Las tres aguas sintéticas utilizadas, emulan las siguientes aguas residuales industriales:

- Agua residual rica en etanol similar a la generada en la fabricación de vinos y licores.
- Agua residual compuesta por hidratos de carbono, similar a la producida por las industrias del almidón y el azúcar.
- Agua residual con alto contenido de proteína, representando los efluentes de la industria de conservas de atún.

Uno de los aspectos críticos en la monitorización *on-line* del proceso es el déficit de instrumentos robustos y confiables. Como aporte a solucionar esta problemática, en el capítulo 3 se presentan los estudios y la validación de metodologías de valoración *on-line* de la alcalinidad y ácidos grasos volátiles en reactores anaerobios, incluyendo la prueba y validación de un prototipo de analizador automático operando con tres metodologías diferentes; desarrolladas por INRA (Francia, Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas), AppliTek (Bélgica, empresa de desarrollo y comercialización de sensores *on-line*) y Biomath (Bélgica, grupo de investigación de la Universidad de Ghent).

Resumen

Los estudios se realizaron utilizando el analizador denominado ANASENSE®, equipo desarrollado en el marco del proyecto Europeo TELEMAC (TELEMonitoring and Advance telecontrol of high yield wastewater treatment). La validación tanto del analizador como de las metodologías de análisis se llevó a cabo en la planta piloto del Departamento de Ingeniería Química de la USC, utilizando para ello el reactor híbrido USBF descrito en el capítulo 2.

A continuación se realizó la validación del equipo en la depuradora de aguas residuales industriales de la cervecera Estrella de Galicia Hijos de Rivera S.A. Respecto a las metodologías estudiadas, las de INRA y Applitek presentaron en general buena precisión y exactitud para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV, 0 a 4900 mg·L⁻¹) y bicarbonato (0 a 50 mg·L⁻¹). Por otro lado, las metodologías Biomath permiten la determinación, aunque con un margen de error considerable, de otros compuestos como amonio y ácido láctico, generando resultados cualitativos que permiten estimar tendencias. La validación del equipo en ambiente industrial permitió detectar algunas debilidades en su funcionamiento, relacionadas con su robustez. Los principales fallos están relacionados con la presencia de sólidos en el efluente y los consiguientes errores en la toma y análisis de la muestra. Posterior a la validación del ANASENSE® y de las tres metodologías de valoración *on-line* de la alcalinidad y ácidos grasos volátiles, se integró a la planta piloto anaerobia una versión comercial del sensor utilizando la metodología INRA con la finalidad de realizar los estudios de selección de variables para la identificación de perturbaciones en digestores anaerobios.

En el capítulo 4 se realiza el análisis dinámico del comportamiento de un digestor anaerobio USBF escala piloto, estudiando su respuesta ante diferentes perturbaciones (impulso-escalón) en la Velocidad de Carga Orgánica (VCO) y frente a un choque térmico. Se realiza el análisis de un conjunto de variables de estado para identificar desestabilizaciones del sistema. Se lleva a cabo la selección del número mínimo de variables que permiten clasificar adecuadamente diferentes estados estacionarios así como la selección de variables para la identificación de perturbaciones. Finalmente se comparan y discuten los resultados obtenidos por ambas aproximaciones.

La selección de variables en estado estacionario se realizó utilizando en primer lugar la técnica de Análisis de Componentes Principales (Principal Components Analysis PCA) para reducir el número de variables; posteriormente se clasificaron los datos en estado estacionario utilizando la técnica de regresión lineal sobre una ventana móvil y por último utilizando la técnica de Análisis Factorial Discriminante (Factorial Discriminate Analysis FDA) se seleccionó el número mínimo de variables que permiten clasificar adecuadamente los diferentes estados estacionarios alcanzados en la experimentación.

Resumen

Estudiando el comportamiento dinámico del sistema se evaluó la respuesta de las variables indicadoras ante las diferentes perturbaciones generadas. Se emplearon parámetros empíricos como: tiempo hasta el valor máximo, tiempo hasta pendiente máxima, nivel de excitación y pendiente normalizada de la respuesta.

Utilizando una sola variable para la clasificación de los diferentes estados estacionarios se presentan diferencias relevantes entre los dos sustratos tipo. Para el sustrato tipo hidratos de carbono las variables caudal de metano (Q_{CH_4}) y caudal de biogás (Q_{Biogas}) permiten aciertos por encima del 90 % en la clasificación, superando inclusive las variables que caracterizan la entrada al proceso carbono orgánico total y carbono inorgánico total en la entrada (TOCe y TICe). Mientras que para el sustrato proteína la clasificación en los diferentes estados estacionarios es más deficiente cuando se utiliza una sola variable y solo las variables TOCe y TICe logran clasificaciones cercanas al 80%

Utilizando combinaciones de 2 y 3 variables para el sustrato tipo hidratos de carbono y proteína respectivamente, se encontró que las combinaciones que mejor clasifican los diferentes estados estacionarios para ambos sustratos tipo son: ácidos grasos volátiles - alcalinidad parcial - caudal de metano y ácidos grasos volátiles - alcalinidad parcial - caudal de biogás.

Se identificó la pendiente normalizada como el parámetro clave en la detección de perturbaciones en la VCO, debido a que dicho parámetro representa la velocidad de respuesta del sistema frente a cambios en las características del residuo o cambios en las condiciones de operación del sistema. Por lo tanto para diagnóstico y control del proceso es más conveniente realizar la evaluación del cambio relativo del valor de las variables con el tiempo que utilizar el valor absoluto de la variable.

Se encontró que la concentración de monóxido de carbono en fase gas tiene una utilidad muy reducida en la detección de perturbaciones, utilizando dicha variable solo fue posible detectar perturbaciones tipo pulso en el sustrato tipo hidratos de carbono. Por su parte la concentración de hidrógeno en fase gas es una variable que permite la detección de perturbaciones en la VCO (tipo pulso y escalón) en ambos sustratos estudiados. Sin embargo se debe tener en cuenta que para el sustrato tipo carbohidratos la concentración de hidrógeno en fase gas depende directamente del grado de acidificación del sustrato al ingresar al reactor, este hecho puede generar un diagnóstico errado del estado del proceso.

Para ambos sustratos las variables: caudal de metano, caudal de biogás y ácidos grasos volátiles son adecuadas en la detección de perturbaciones en la VCO. De acuerdo con los resultados de este trabajo y considerando los niveles de complejidad y coste de monitorización se proponen tres niveles de instrumentación:

Resumen

- instrumentación básica (pH, temperatura y caudales): pHmetros; sensores de temperatura y caudalímetros.
- instrumentación necesaria (QBiogas, AGV y AP): analizador de H₂ en fase gas; caudalímetro y analizador titrimétrico de AGV y AP.
- Instrumentación conveniente (H₂): analizador de hidrógeno en fase gas.

Finalmente en el capítulo 5 se presentan y discuten los resultados obtenidos del seguimiento de una biomasa anaerobia sometida a diferentes sustratos tipo (etanol, hidratos de carbono y proteína). El estudio se llevó a cabo en reactores de laboratorio empleando los tres sustratos tipo durante un año de operación y en planta piloto para el sustrato tipo que contenía hidratos de carbono, también durante 1 año.

Se evaluaron las características físicas, composición química, características hidrodinámicas y las actividades metanogénica y acidogénica de la biomasa anaerobia. La morfología de los microorganismos presentes en la superficie de los gránulos se estudió aplicando microscopía electrónica de barrido (SEM).

Combinando la técnica de identificación de microorganismos por FISH con microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal se realizó la identificación y cuantificación relativa de algunos de los principales microorganismos presentes en la biomasa. La configuración de los reactores utilizados influyó directamente en las características finales de la biomasa. En el reactor piloto híbrido (USBF), al cambiar de un sustrato simple (etanol) a un sustrato no acidificado (dextrina), se presentó la retención de biomasa floculenta, la expansión del lecho de lodo, el lavado de biomasa y el posterior deterioro de la biomasa granular al presentarse la ruptura parcial de los gránulos. Por el contrario, en los reactores UASB, la biomasa floculenta fue lavada y, por tanto, permaneció la estructura granular del lodo.

Al someter la biomasa granular aclimatada a un sustrato simple (etanol), a sustratos complejos o no acidificados (dextrina y proteína), los gránulos originales fueron colonizados por nueva biomasa, compuesta por bacterias acidogénicas y microorganismos metanogénicos. Dicha colonización generó un aumento importante en el tamaño de los gránulos y aumentos considerables en la actividad acidogénica específica y en la actividad metanogénica hidrogenófila.

Los resultados obtenidos indican que el proceso de colonización de gránulos previamente formados, depende del tipo de sustrato utilizado, de las condiciones hidrodinámicas del reactor y de la configuración del reactor. Se comprobó que utilizando un sustrato tipo carbohidratos se presentan problemas de expansión del lecho de lodo, generación de biomasa floculenta, pérdida de biomasa y disminución en la actividad metanogénica acetoclástica de dicha biomasa.

Resumo

A aplicación da dixestión anaerobia no tratamento de augas residuais tanto industriais como municipais é unha tecnoloxía actualmente en proceso de expansión, que día a día está sendo máis aplicada á solución de problemas específicos de control da contaminación da auga. Con todo a monitorización avanzada, a diagnose e o control do devandito proceso non están consolidados e requirese dunha maior investigación orientada a fortalecer o proceso fronte a perturbacións e desestabilizacións.

No capítulo 1 achégase unha visión sobre o contexto no que se desenvolveu a tese, introducindo algúns conceptos básicos sobre a aplicación, vantaxes e limitacións da dixestión anaerobia; identificando a monitorización, diagnose e control do proceso como actividades claves na aplicación desta tecnoloxía de depuración de augas residuais. Preséntanse ademais algúns aspectos básicos da microbioloxía do proceso; así como os fundamentos da ecoloxía microbiana e características técnicas da biomasa granular utilizada usualmente neste tipo de procesos.

No capítulo 2 preséntanse os métodos analíticos e materiais utilizados no desenvolvemento do traballo experimental. Os métodos analíticos agrúpanse de acordo coa fase á que pertencen (líquido, sólido ou gas). No apartado de materiais consígnase a composición das augas residuais sintéticas e a descrición da planta piloto anaerobia utilizada na experimentación.

O capítulo 3 presenta os estudos e a validación de metodoloxías de valoración *on-line* da alcalinidade e ácidos graxos volátiles en reactores anaerobios, incluíndo a proba e validación dun prototipo de analizador automático operando con tres metodoloxías diferentes; desenvolvidas por INRA (Francia, Instituto Nacional de Investigacións Agronómicas), AppliTek (Bélxica, empresa de desenvolvemento e comercialización de sensores *on-line*) e Biomath (Bélxica, grupo de investigación da Universidade de Ghent). Das metodoloxías estudadas, as de INRA e Applitek presentaron en xeral unha resposta adecuada para a determinación de ácidos graxos volátiles (AGV, 0 a 4900 mg·L⁻¹) e bicarbonato (0 a 50 mg·L⁻¹). Doutra banda, as metodoloxías Biomath permiten a determinación, aínda que cunha marxe de erro considerable, doutros compostos como amonio e ácido láctico, xerando resultados cualitativos que permiten estimar tendencias.

Posterior á validación do ANASENSE® e das tres metodoloxías de valoración *on-line* da alcalinidade e ácidos graxos volátiles; integrouse á planta piloto anaerobia unha versión comercial do sensor utilizando a metodoloxía INRA coa finalidade de realizar os estudos de selección de variables para a identificación de perturbacións en dixestores anaerobios.

No capítulo 4 realízase a análise dinámica do comportamento dun dixestor anaerobio USBF escala piloto, estudiando a súa resposta ante diferentes perturbacións (impulso/ grade) na Velocidade de Carga Orgánica alimentada e fronte a un choque térmico. Realízase a análise dun conxunto de variables de estado para identificar desestabilizacións do sistema. Lévese a cabo a selección do número mínimo de variables que permiten clasificar adecuadamente diferentes estados estacionarios así como a selección de variables para a identificación de perturbacións. Finalmente compáranse e discútense os resultados obtidos por ambas as aproximacións.

A selección de variables en estado estacionario realizouse utilizando, en primeiro lugar, a técnica de Análise de Compoñentes Principais (Principal Component Analysis PCA) para reducir o número de variables; posteriormente, clasificáronse os datos en estado estacionario utilizando a técnica de regresión lineal sobre unha fiestra móbil e, para rematar, utilizando a técnica de Análise Factorial Discriminante (Factorial Discriminant Analysis FDA) seleccionouse o número mínimo de variables que permiten clasificar adecuadamente os diferentes estados estacionarios alcanzados na experimentación.

Estudiando o comportamento dinámico do sistema, avalíouse a resposta das variables indicadoras ante as diferentes perturbacións xeradas. Empregáronse parámetros empíricos como: tempo ata o valor máximo, tempo ata a pendente máxima, nivel de excitación e pendente normalizada da resposta.

Utilizando unha soa variable para a clasificación dos diferentes estados estacionarios preséntanse diferenzas relevantes entre os dous substratos tipo. Para o substrato tipo hidratos de carbono as variables caudal de metano (Q_{CH_4}) e caudal de biogás ($Q_{Biogás}$) permiten acertos por encima do 90 % na clasificación, superando inclusive as variables que caracterizan a entrada ao proceso carbono orgánico total y carbono inorgánico total na entrada (TOCe e TICe). Mentres que para o substrato proteína a clasificación nos diferentes estados estacionarios é máis deficiente cando se utiliza unha soa variable e só as variables TOCe e TICe logran clasificacións próximas ao 80%. Utilizando combinacións de 2 e 3 variables para o substrato tipo hidratos de carbono e proteína respectivamente, atopouse que as combinacións que mellor clasifican os diferentes estados estacionarios para ambos os substratos tipo son: ácidos graxos volátiles - alcalinidade parcial - caudal de metano e ácidos graxos volátiles - alcalinidade parcial - caudal de biogás. Atopouse que a concentración de monóxido de carbono en fase gas ten unha utilidade moi reducida na detección de perturbacións, utilizando dita variable só foi posible detectar perturbacións tipo pulso no substrato tipo hidratos de carbono. Pola súa banda a concentración de hidróxeno en fase gas é unha variable que permite a detección de perturbacións na VCO (tipo pulso e grade) en ambos substratos. Con todo débese ter en conta que para o substrato tipo carbohidratos a concentración

de hidróxeno depende directamente do grao de acidificación do substrato ao ingresar ao reactor, este feito pode xerar un diagnóstico errado do estado do proceso. Para ambos substratos as variables: caudal de metano, caudal de biogás y ácidos graxos volátiles son adecuadas na detección de perturbacións na VCO. De acordo cos resultados deste traballo e considerando os niveis de complexidade e custo de monitorización, propóñense tres niveis de instrumentación:

- Instrumentación básica (pH, temperatura e caudais): pHmetros; sensores de temperatura e caudalímetros.
- Instrumentación necesaria (caudal de biogás, ácidos graxos volátiles e alcalinidade parcial): caudalímetro de gas e analizador titrimétrico de ácidos graxos volátiles e alcalinidade parcial.
- Instrumentación conveniente (concentración de hidróxeno): analizador de hidróxeno en fase gas.

Finalmente no capítulo 5 preséntanse e discútense os resultados obtidos do seguimento dunha biomasa anaerobia sometida a diferentes substratos tipo (etanol, hidratos de carbono e proteína). A experimentación levouse a cabo en reactores de laboratorio empregando os tres substratos tipo durante un ano de operación e en planta piloto para o substrato tipo que contiña hidratos de carbono, tamén durante 1 ano. Avaliáronse as características físicas, a composición química, as características hidrodinámicas e as actividades metanoxénica e acidoxénica da biomasa anaerobia. A morfoloxía dos microorganismos presentes na superficie dos gránulos estídiouse aplicando microscopía electrónica de varrido (SEM).

Combinando a técnica de identificación de microorganismos por FISH con microscopía de epifluorescencia e microscopía confocal, realizouse a identificación e cuantificación relativa dalgúns dos principais microorganismos presentes na biomasa. A configuración dos reactores utilizados influíu directamente nas características finais da biomasa. No reactor piloto híbrido (USBF), ao cambiar dun substrato simple (etanol) a un substrato non acidificado (dextrina), presentouse a retención de biomasa floculenta, a expansión do leito de lodo, o lavado de biomasa e a posterior deterioración da biomasa granular ao presentarse a ruptura parcial dos gránulos. Pola contra, nos reactores UASB, a biomasa floculenta foi lavada e, xa que logo, permaneceu a estrutura granular do lodo.

Ao someter a biomasa granular aclimatada a un substrato simple (etanol), a substratos complexos ou non acidificados (dextrina e proteína), os gránulos orixinais foron colonizados por nova biomasa, composta por bacterias acidoxénicas e microorganismos metanoxénicos. Dita colonización xerou un aumento importante no tamaño dos gránulos e aumentos considerables na actividade acidoxénica específica e na actividade metanoxénica hidroxenófila.

Resumo

Os resultados obtidos indican que o proceso de colonización de gránulos previamente formados, depende do tipo de substrato utilizado, das condicións hidrodinámicas do reactor e da configuración do reactor.

Comprobouse que utilizando un substrato tipo carbohidratos preséntanse problemas de expansión do leito de lodo, xeración de biomasa floculenta, perda de biomasa e diminución na actividade metanoxénica acetoclásta da devandita biomasa.

Abstract

The application of anaerobic digestion to the treatment of industrial and municipal wastewaters has been growing consistently. Nevertheless, technologies for the monitoring, diagnosis and control of the process are not consolidated topics, and will require targeted research to develop new practical tools for industrial applications.

Chapter 1 shows a general vision of the context under which this thesis was developed introducing key concepts on the application, advantages and limitations of anaerobic digestion. Also covered is the identification of the process monitoring, diagnosis and control activities that are key factors to the successful application of this technology. In addition to the microbiology of the process, this chapter includes fundamentals of microbial ecology and the characterization of granular biomass.

In Chapter 2, analytical methods and materials employed to conduct the experimental work here reported are described. The analytical methods were classified according to the phase of the sample (i.e., liquid, solid or gas). Analytical methods for the determination of specific parameters and characterization of materials used in only part of the work here reported were described in the corresponding chapter. Specifically included in this chapter are the composition of the synthetic wastewaters (ethanol-based, carbohydrates-based and protein-based) and the description of the anaerobic pilot plant used for experimentation.

One critical aspect in the *on-line* monitoring of the anaerobic digestion process is the deficit of robust and reliable instruments. As a contribution to solve this situation, Chapter 3 presents the validation of a prototype of an automatic analyzer of alkalinity and concentration of volatile fatty acids operating under three different methodologies. These three approaches were developed by INRA (France, National Institute of Agronomic Research), AppliTek (Belgium, developer and vendor of *on-line* sensors) and Biomath (Belgium, research group at the University of Ghent). Additional studies were made using the analyzer called ANASENSE®, an equipment developed under the framework of the European project TELEMAT (Tele-monitoring and Advanced Tele-control of High-Yield Wastewater Treatment). Among the methodologies studied, both INRA and Applitek displayed good performance in the determination of volatile fatty acids (VFA, 0 to 4900 mg·L⁻¹) and bicarbonate (0 to 50 mg·L⁻¹). On the other hand, the Biomath methodology was capable of producing estimations of the concentration of other compounds such as ammonium and lactic acid, which can be used to examine system tendencies.

In Chapter 4, a dynamic analysis of the behaviour of a pilot USBF unit is reported, including its response to various system disturbances. The analysis of a set of state variables is made to identify possible system destabilizations. The selection of the minimum number of variables is carried to allow a suitable classification of the different steady states as well as the selection of the variables needed for the identification of disturbances. Finally the results obtained by both approaches are compared and discussed.

The selection of variables under steady-state conditions was made using as a first step a Principal Components Analysis (PCA) to reduce the dimensions of the data. Next, the steady state data was classified using the technique of linear regression on a movable window. Finally, a Factorial Discriminate Analysis technique (FDA) was used to select the minimum set of variables required to characterize process performance. This technique makes possible to determine the data projection improving the separation of previously defined groups.

The study of the dynamic behaviour of the system was made evaluating the response variables using empirical parameters such as response time, level of the excitation and standardized slope of the response. Using only one variable for the carbohydrates-based wastewater, methane flow and biogas flow achieved the best state classification (over 95% of success). For protein-based wastewater this single variable classification was more deficient. When two or three variables were used for both type of wastewater, the following two combinations achieved a classification with over 95% success: volatile fatty acids-partial alkalinity-methane flow and volatile fatty acids-partial alkalinity-biogas flow.

The carbon monoxide concentration in gas phase had a lower utility in the detection of disturbances, detecting pulse disturbances only for carbohydrates-based wastewater. The hydrogen concentration in gas phase is a variable that allows the detection of disturbances in both synthetic wastewaters. Nevertheless, for carbohydrates-based wastewater, the hydrogen concentration in the gas phase depends on the acidification degree of substrate before feeding it into the reactor; this fact can cause errors in the diagnosis of the state of the process.

Finally, Chapter 5 presents the results obtained when granules developed from UASB reactors that treat different types of wastewaters (ethanol, carbohydrates and protein-based synthetic wastewaters) were studied. Granule parameters (size distribution, density, settlement characteristics, elemental composition, and acidogenic and methanogenic activities) were analyzed along with identification of micro-organisms by FISH to better understand granule behaviour and its formation process. The physico-chemical properties of granules depend largely upon the type of substrate on which they are grown. Granules fed with ethanol are much more compact than those developed in protein and carbohydrate-based media. Further, microbial distributions in anaerobic granules depend also on the type of

Abstract

wastewater; granules fed with carbohydrates and proteins presented higher acidogenic bacteria colonization. Members of the Methanosaetaceae family were the dominant methanogens in all three types of granules, while Methanobacteria were co-dominant in granules fed with carbohydrates and proteins. These results were verified by comparing the SMA using different substrates.

Capítulo 1

Introducción general

Resumen

Este capítulo aporta una visión y el estado del arte sobre el contexto en el que se desarrolló este trabajo de investigación. Se introducen diferentes conceptos sobre la aplicación, ventajas y limitaciones de la digestión anaerobia. Identificando la monitorización, diagnóstico y control del proceso como actividades claves en la aplicación exitosa de esta tecnología de depuración de aguas residuales.

Se hace una revisión de los diferentes aspectos de la microbiología del proceso de interés para un mejor seguimiento de esta Tesis; así como los fundamentos de ecología microbiana y características técnicas (referentes a su comportamiento en reactores) de la biomasa granular utilizada usualmente en este tipo de proceso. Finalmente se presenta la estructura de la tesis y sus principales objetivos.

Índice

1.1. Digestión anaerobia

1.1.1. Aplicación, ventajas y limitaciones

1.1.2. Monitorización. Diagnóstico y control

1.2. Ecología microbiana de la digestión anaerobia

1.2.1. Microbiología

1.2.2. Características de la biomasa granulada anaerobia

1.3. Estructura de la tesis

1.4. Referencias

1.1. Digestión anaerobia

1.1.1. Aplicación, ventajas y limitaciones

La digestión anaerobia es un proceso complejo que se realiza en múltiples etapas y en el que participan numerosos microorganismos (cerca de 140 especies están relacionados con las diferentes etapas), a través de dichas etapas se convierte la materia orgánica en los compuestos más reducido y oxidado del carbono (CH_4 y CO_2), respectivamente, sin requerir de un aceptor externo de electrones como el oxígeno o el nitrógeno (Steyer *et al.*, 2006).

La digestión anaerobia está presente en muchos ecosistemas naturales (pantanos, ciénagas) y artificiales, contribuyendo al reciclaje de nutrientes y de materia orgánica. La digestión anaerobia se ha utilizado tradicionalmente en la estabilización de residuos líquidos domésticos a través de tanques sépticos y en la mineralización de los lodos provenientes de la depuración de aguas residuales municipales utilizando digestores de lodos (van Lier *et al.*, 2001); con la limitante de requerir largos tiempos de residencia (20 a 30 días) para la estabilización del residuo. Posteriormente con el desarrollo de sistemas de auto-inmovilización (biomasa granular) o inmovilización sobre soporte (biomasa adherida) se logró separar la dependencia del independizar el tiempo de residencia hidráulico del tiempo de residencia de los lodos, con lo cual se desarrollan una nueva generación de reactores denominados de alta carga.

El proceso de digestión anaerobia presenta varias ventajas en su aplicación a la depuración de aguas residuales. Las más relevantes son: alta capacidad de depuración de aguas residuales de alta carga, muy baja producción de lodos (5 a 10 veces menos que los procesos aerobios) (Steyer *et al.*, 2006), bajo requerimiento de nutrientes (Spanjers and van Lier, 2006), producción potencial de metabolitos intermedios valiosos (Rodríguez, 2006) y posibilidad de recobrar energía a través de la utilización del metano generado u orientando el proceso a la producción de hidrógeno (Steyer *et al.*, 2006).

Sin embargo la digestión anaerobia tiene algunas limitaciones y desventajas. La baja producción de lodo está relacionada directamente con la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos, por dicha razón la etapa de arranque del proceso es lenta y difícil, requiriéndose entre 2 y 6 meses (dependiendo del tipo de reactor) antes de alcanzar condiciones de operación estables.

Los microorganismos metanogénicos son altamente sensibles a las perturbaciones del proceso como sobrecargas orgánicas e hidráulicas, así como presencia de sustancias tóxicas o inhibitoras. El pH afecta especialmente a dichos microorganismos debido al rango estrecho de pH óptimo para su funcionamiento

(6,5 – 7,5). A pesar de los numerosos estudios recientes, la distribución espacial de los microorganismos en los flóculos, gránulos y biopelículas no está totalmente comprendida; sin embargo se intuye que dicha distribución está íntimamente relacionada con la eficacia y el rendimiento del proceso (Steyer *et al.*, 2006).

Las limitaciones y desventajas mencionadas, pueden explicar el por que la digestión anaerobia no se utiliza en mayor medida en la depuración de aguas residuales industriales. La falta de un conocimiento completo del proceso genera desconfianza y retrasa posibles aplicaciones industriales. Por estas razones la investigación debe orientarse tanto en la optimización y búsqueda de nuevas aplicaciones del proceso como en el avance de la monitorización y control de la digestión anaerobia que garantice la robustez del proceso frente a las perturbaciones (van Lier *et al.*, 2001).

1.1.2. Monitorización, diagnóstico y control

Instrumentación

Spanjers y van Lier (2006), evaluaron la instrumentación de aproximadamente 400 depuradoras industriales anaerobias, encontrando que la instrumentación básica utilizada *on-line* en dichas plantas (95% de las instalaciones) incluye medidores de pH, temperatura, flujo de agua, flujo de biogás, niveles y presiones. La monitorización del proceso usualmente se complementa a través de parámetros determinados en laboratorio, los cuales típicamente son: DBO, DQO, turbidez, composición del biogás, AGV, alcalinidad y macro-nutrientes como nitrógeno, fósforo y azufre; eventualmente se realiza la determinación en forma manual de la altura del lecho de lodo. Solamente un 10% de las depuradoras evaluadas cuentan con uno o varios analizadores *on-line* para DQO, TOC, AGV, alcalinidad, turbidez y composición del gas y solo en un caso se realiza la medición *on-line* de hidrógeno en la fase gas.

De acuerdo con lo anterior se concluye que en la mayoría de las depuradoras anaerobias industriales estudiadas, el proceso se opera en forma manual a través de técnicos capacitados que se apoyan en mediciones *off-line* realizadas en el laboratorio. El estudio en referencia identificó la necesidad de incrementar el nivel de automatización y control del proceso reduciendo la intervención de operadores y personal de laboratorio. Sin embargo la principal dificultad en la aplicación del control automático se debe a la falta de instrumentos *on-line* disponibles a bajo costo, que permitan monitorizar las principales variables de control del proceso de digestión anaerobia (Spanjers and van Lier, 2006).

Algunos investigadores se inclinan por utilizar las variables de la fase líquida como los mejores indicadores teniendo en cuenta que la fase líquida refleja el ambiente microbiológico donde ocurren las principales reacciones en digestión anaerobia (Björnsson *et al.*, 2001). En este sentido existen limitaciones en la monitorización de la fase gas; debido a que no es posible estimar las concentraciones en fase líquida de hidrógeno, a partir del equilibrio con las concentraciones de dichos gases en fase gas. Dichos cálculos subestiman de 10 a 100 veces la concentración del hidrógeno en la fase líquida (Pauss *et al.*, 1990; Kuroda *et al.*, 1991; Pauss y Guiot, 1993; Björnsson *et al.*, 2001). Sin embargo los sensores desarrollados para monitorizar gases disueltos (H_2 y CH_4) en la fase líquida presentan problemas de ensuciamiento lo cual dificulta su aplicación a escala industrial (Björnsson *et al.*, 2000).

Vanrolleghem y Lee (2003) evaluaron el estado del arte de la instrumentación para monitorización *on-line* de procesos de tratamiento de aguas residuales, incluyendo el proceso de digestión anaerobia. Dichos investigadores identifican la monitorización de la alcalinidad y los AGV en la fase líquida como una alternativa útil teniendo en cuenta que los AGV son los principales productos intermedios en la digestión anaerobia y su acumulación indica generalmente sobrecarga o presencia de sustancias inhibitorias o tóxicas.

A pesar de estas bondades existen pocas implementaciones exitosas a escala industrial, de las cuales se destaca la utilización de cromatografía gaseosa; sin embargo esta técnica tiene alto coste y requiere de la preparación previa de la muestra. Los mismos autores plantean que las técnicas basadas en titrimetría son una alternativa a esta problemática. Utilizando la valoración en dos pasos o valoración en el rango de pH 11 a 3 es posible cuantificar conjuntamente el contenido de AGV y bicarbonato en una muestra; la relación entre dichas variables da una idea aproximada de la capacidad tampón del sistema disponible para neutralizar los AGV.

En este contexto, el capítulo 3 de esta tesis presenta el estudio y validación de metodologías de valoración *on-line* de la alcalinidad y ácidos grasos volátiles en reactores anaerobios, incluyendo la prueba y validación de un prototipo de analizador automático denominado ANASENSE®, equipo desarrollado en el marco del proyecto Europeo TELEMAC (TELEMonitoring and Advance telecontrol of high yield wastewater treatment).

Posterior a la validación, una versión comercial del sensor se integró a la planta piloto anaerobia con la finalidad de realizar los estudios de estado estacionario y transitorio y la selección de variables para la identificación de perturbaciones.

Objetivos del control

Generalmente el objetivo de la digestión anaerobia es realizar la completa mineralización de la materia orgánica convirtiéndola en CO₂ y CH₄. Sin embargo existen algunas aplicaciones de la digestión anaerobia que se orientan a otros objetivos (Steyer *et al.*, 2006), como:

- fermentaciones parciales para producir un producto específico (etanol, hidrógeno, ácidos grasos volátiles), en las cuales el objetivo fundamental del control es obtener la mayor cantidad posible de producto,
- digestores primarios de lodos de plantas depuradoras municipales, donde el control debe asegurar una operación estable que optimice la producción de CH₄;
- digestores de sólidos orientados a la metanogenización máxima de los residuos y
- digestores de alta tasa que depuran aguas residuales con alta carga orgánica, en los cuales los objetivos del control se centran en la operación estable del proceso previniendo y actuando en forma temprana frente a las de perturbaciones, minimizando costes y cumpliendo con las restricciones de calidad del efluente.

Tipos de control automático

Steyer *et al.* (2006), identifican dos aproximaciones al control automático del proceso de digestión anaerobia: control basado en modelos (control adaptativo por ejemplo) y control no basado en modelos (por ejemplo, el control utilizando lógica fuzzy). La Tabla 1.1 presenta la comparación entre los requerimientos de los dos enfoques mencionados. De acuerdo con la experiencia de Steyer *et al.*, (2006) la aplicación de ambos enfoques consigue resultados comparables. Sin embargo, contar con una combinación de varios sensores *on-line* permite detectar fallos en los sensores y constituir un sistema de alertas tempranas de perturbaciones y cambios del proceso; ambos elementos fundamentales en la operación y control de digestores anaerobios de alta tasa.

Tabla 1.1. Comparación de los requerimientos de control basado o no en modelos*.

Control basado en modelos	Control no basado en modelos
Sensores simples	Sensores avanzados
Se necesita un modelo simple	No se necesita modelo
Conocimiento de las concentraciones de entrada al proceso	No se necesita conocer las concentraciones de entrada al proceso
Cálculos matemáticos avanzados	Cálculos simples

*Tomado de Steyer *et al.*, 2006.

Selección de variables para diagnosis y control

El desarrollo de cualquier sistema de monitorización-diagnosis control de la digestión anaerobia requiere de la selección de un grupo de variables, también denominadas indicadores, que den información del estado metabólico del proceso y que permitan realizar la diagnosis y el control del proceso (Castellano *et al.*, 2007). Estas variables deben cumplir en lo posible con las siguientes características principales: alta sensibilidad, respuesta rápida y coste de monitorización bajo (Moletta, 1989; Switzembaum *et al.*, 1990).

Numerosos investigadores han estudiado y propuesto diversas variables y grupos de variables como indicadores de la estabilidad del proceso de digestión anaerobia y de la presencia o no de perturbaciones, en la Tabla 1.2 se presenta una síntesis de algunas de las propuestas. Sin embargo no existe una conclusión definitiva sobre cual es la variable o grupo de variables que describen mejor el proceso y permiten identificar de forma adecuada el estado del proceso (Castellano *et al.*, 2007) o detectar en forma temprana las perturbaciones. De otro lado en las investigaciones referidas en la Tabla 1.2 se utilizan diversidad de aguas residuales o sintéticas, no se emplean herramientas objetivas en la selección de variables y solo se compararon al mismo tiempo un número limitado de variables.

Frente a la problemática enunciada; el capítulo 4 de esta tesis, se orienta a sistematizar el estudio de indicadores para dos aguas residuales (carbohidratos y proteína) utilizando datos de planta piloto. Usando herramientas de la estadística como el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis factorial discriminante (FDA) en la selección de indicadores. Se realiza la comparación de los mejores indicadores para clasificar los diferentes estados estacionarios con los indicadores que alertan en forma temprana la ocurrencia de una perturbación. El estudio pretende compatibilizar ambos grupos de indicadores, simplificando el número y la complejidad de las variables a monitorizar con el fin de optimizar recursos y posibilitar la implementación a escala industrial de sistemas de monitorización robustos y de bajo coste.

Tabla 1.2. Resumen de las variables propuestas por diferentes investigadores para la identificación del estado del proceso de digestión anaerobia.

Fase	Variable(s)	Tipo de agua residual o sintética	Referencia	
LÍQUIDA	H ₂ y CH ₄	Glucosa	Whitmore <i>et al.</i> (1985, 1986) Whitmore and Lloyd (1986)	
	H ₂	Glucosa Glucosa, proteína y lípidos	Cord-Ruwisch <i>et al.</i> (1997) Björnsson <i>et al.</i> (2001)	
	Alcalinidades (total y parcial)	Lodos	Ripley <i>et al.</i> (1986)	
	Alcalinidad bicarbonática	Fabricación de helados	Hawkes <i>et al.</i> (1994)	
	AGV	Estiércol	Ahring <i>et al.</i> (1995)	
	S	H ₂	Fabricación de cerveza Glucosa, AGV y H ₂ Vinazas Ácido butírico AGV y glucosa Levadura panadería	Archer <i>et al.</i> (1986) Harper and Pohland (1987) Moletta (1989) Slater <i>et al.</i> (1990) Jones <i>et al.</i> (1992) Guwy <i>et al.</i> (1997)
H ₂ y CO		Lodos y adición de metales pesados	Hickey and Switzenbaum (1990, 1991)	
H ₂ , CH ₄ y CO ₂		Vinazas	Mathiot <i>et al.</i> (1992)	
H ₂ y QBiogas		Fabricación polietileno (PET)	Huang <i>et al.</i> (2000)	
H ₂ y QCH ₄		Agua rica en etanol	Ruiz (2005) Castellano <i>et al.</i> (2007)	
LÍQUIDA		QBiogas y pH	Peptona, extracto de levadura y glucosa	Liu <i>et al.</i> , 2004a, 2004b, 2006

1.2. Ecología microbiana de la digestión anaerobia

1.2.1. Microbiología

Tal como se mencionó anteriormente la degradación anaerobia de la materia orgánica es un proceso complejo que se lleva a cabo a través de múltiples etapas en las que intervienen numerosos microorganismos que utilizan en forma relativamente secuencial los productos metabólicos generados por cada grupo. Para que el proceso sea estable se requiere el acoplamiento de los diferentes grupos de microorganismos de manera que no se acumulen cantidades excesivas de productos intermedios.

Se han sugerido diferentes esquemas con el fin de simplificar y entender mejor el proceso. Un esquema ampliamente aceptado contempla cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

El proceso se inicia con la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos por la acción de enzimas extracelulares generadas por bacterias hidrolíticas y fermentativas. Los productos de esta primera etapa son moléculas de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y alcoholes. Dichas moléculas son transportadas a través de la membrana celular ingresando a los microorganismos acidogénicos que las convierten en ácidos grasos volátiles y algunos compuestos reducidos como el etanol, además de H_2 y CO_2 .

En la acetogénesis los AGV de 3 a 8 átomos de carbono y el etanol son convertidos a acetato, H_2 y CO_2 por las bacterias productoras obligadas de hidrógeno (OHPA). Esta etapa, requiere para ser viable energéticamente de presiones parciales de hidrógeno muy bajas; por lo que debe realizarse en forma sintrófica con microorganismos metanogénicos que se encargan de remover el hidrógeno del medio. Esta asociación se conoce como "transferencia interespecífica de hidrógeno". La distancia entre organismos productores y consumidores es un factor crítico en esta transferencia, por lo que el estudio de la agrupación y distribución de los microorganismos es fundamental para comprender adecuadamente el proceso.

Finalmente los microorganismos metanogénicos convierten el acetato a metano y CO_2 , o reducen el CO_2 a metano. Se diferencian dos grandes grupos de microorganismos metanogénicos: acetoclásticos e hidrogenotróficos. Los primeros metanogenizan el acetato y producen CO_2 , que al disolverse forma una solución tampón de bicarbonato que regula el pH del medio. Los microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos o autotróficos, producen metano a partir de H_2 y CO_2 .

La velocidad relativa de cada una de estas etapas es diferente, por lo tanto la velocidad global del proceso está controlada por la etapa más lenta. Si la materia orgánica hidroliza rápidamente el proceso más lento será la metanogénesis y por lo tanto dicha etapa controlará la velocidad del proceso.

1.2.2. Características de la biomasa granular anaerobia

Los reactores anaerobios de última generación, presentan como cualidad principal su capacidad para retener biomasa. Esta característica permite separar el tiempo de retención celular del tiempo de retención hidráulico. La capacidad de retener biomasa depende en gran medida de la formación de agregados, denominados gránulos, que pueden alcanzar una alta actividad metanogénica (2 g DQO-CH₄:g SSV·d⁻¹) y una alta velocidad de sedimentación (60 m·h⁻¹) (Hulshoff Pol *et al.*, 2004).

El conocimiento de la estructura y del desarrollo de los gránulos son las claves para controlar su proceso de formación y mantenimiento. Existen numerosos trabajos de investigación sobre la estructura, características físicas, composición química, composición microbiológica y actividad de la biomasa granular anaerobia.

La composición y la estructura de los gránulos metanogénicos están relacionadas con el tipo de sustrato utilizado. Se han diferenciado dos tipos de estructuras. Estructura por capas cuando el sustrato es de fácil degradación como los carbohidratos (MacLeod *et al.*, 1990; Guiot *et al.*, 1992; Vanderhaegen *et al.*, 1992), dicha tipología de gránulos presentan una capa externa compuesta principalmente por bacterias acidogénicas; una capa intermedia compuesta por microorganismos acetogénicos (productores de H₂) y metanogénicos consumidores de H₂ y una capa interna de microorganismos metanogénicos

La otra tipología la podemos denominar distribución al azar de los microorganismos y se presenta cuando se utilizan sustratos complejos como proteína y AGV (Grotenhuis *et al.*, 1991; Fang *et al.*, 1994a, 1994b, 1995; Fang, 2000). Sin embargo no existe acuerdo en la comunidad científica sobre dichas tipologías, ya que diferentes investigadores han detectado una estructura por capas aún con sustratos complejos o AGV (Sekiguchi *et al.*, 1999 y Díaz *et al.*, 2003).

Respecto a la composición microbiológica existe consenso en la mayoría de los investigadores sobre el predominio del microorganismo acetotrófico *Methanosaeta* en los gránulos anaerobios y su importancia en la estructuración del gránulo debido a su morfología filamentosa (Dolfing, 1986; Guiot *et al.*, 1992; Fang, 2000; Saiki *et al.*, 2002; Angenent *et al.*, 2004; Hulshoff Pol *et al.*, 2004).

Las técnicas de biología molecular y específicamente la técnica de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) han significado un avance importante en el estudio de los microorganismos anaerobios. Su utilización permite tanto la identificación de los microorganismos específicos como el estudio de su distribución espacial (Cloete and Muyima, 1997). En esta dirección se han desarrollado numerosos trabajos de investigación sobre la estructura, composición y distribución espacial de los microorganismos en la biomasa granular (Rocheleau et al., 1999; Saiki et al., 2002; Lanthier et al., 2002; Díaz et al., 2003; Batstone et al., 2004; Chen et al., 2004; Hori et al., 2006; Burak and Yenigün, 2006; Zheng et al., 2006; Baloch et al., 2007).

Las principales características físicas estudiadas en la biomasa granular son: distribución por tamaño, densidad, velocidad de sedimentación, grado de compactación al sedimentar y resistencia a la abrasión y fuerzas mecánicas. Estas características están relacionadas directamente con la posibilidad de mantener los gránulos dentro del sistema, independizando el tiempo de retención hidráulico (TRH) del tiempo de retención de sólidos (TRS) (Batstone and Keller, 2001).

Utilizando diferentes sustratos es posible asociar las actividades específicas de la biomasa anaerobia a cada etapa básica del proceso, de esta manera se pueden caracterizar la capacidad hidrolítica, acidogénica, acetogénica y metanogénica de un lodo granular (Soto *et al.*, 1993). Los resultados de las actividades específicas indican la presencia y cantidad relativa de microorganismos específicos presentes en la biomasa.

Teniendo en cuenta el lento crecimiento de la biomasa anaerobia, una estrategia muy utilizada en el arranque de reactores es la inoculación con biomasa granular de otro reactor. Esta estrategia generalmente implica el cambio en la composición del agua residual y en condiciones ambientales e hidrodinámicas; lo cual produce cambios en las poblaciones microbiológicas y en las características de la biomasa granular. Estudiar la evolución de estos cambios es importante en la definición de estrategias de monitorización y control del arranque del proceso en estas condiciones.

En este contexto el capítulo 5 de esta tesis estudia la dinámica de la ecología microbiana y características técnicas de una biomasa granular sometida a diferentes aguas residuales sintéticas. Evaluando las características y la distribución de los microorganismos presentes en una biomasa granular desarrollada en reactores UASB y USBF, cuando el tipo de sustrato es modificado desde un sustrato acidificado simple a un sustrato no acidificado o a un sustrato complejo.

1.3. Estructura de la tesis

Esta tesis intenta contribuir al campo de la monitorización, diagnóstico y control del proceso de depuración de aguas residuales por digestión anaerobia. En el capítulo 1 se realiza una revisión del contexto actual de la aplicación de la digestión anaerobia, identificando sus ventajas y limitaciones; resaltando además la relevancia de la ecología microbiana de la biomasa granular en el funcionamiento adecuado del proceso.

En el capítulo 2 se presentan los materiales y métodos utilizados en el desarrollo de la tesis, asignándole especial relevancia a las características de la planta piloto anaerobia en la que se desarrollaron los estudios de comportamiento del proceso en estado estacionario y estado dinámico.

Uno de los cuellos de botella en la aplicación del proceso de digestión anaerobia a la depuración de aguas residuales, es el déficit de instrumentos robustos y confiables para la monitorización *on-line* del proceso; lo cual pone de presente la necesidad de avanzar en el diseño, construcción y validación de nuevos analizadores. En esta dirección el capítulo 3 presenta el estudio y validación de metodologías de valoración *on-line* de la alcalinidad y ácidos grasos volátiles en reactores anaerobios, incluyendo la prueba y validación de un prototipo de analizador automático denominado ANASENSE®, equipo desarrollado en el marco del proyecto Europeo TELEMAC (TELEMonitoring and Advance telecontrol of high yield wastewater treatment).

Existen diversas propuestas del uso de variables y grupos de variables como indicadores de la estabilidad del proceso de digestión anaerobia y de la presencia o no de perturbaciones en el mismo. Sin embargo no hay acuerdo entre los investigadores sobre cual es la variable o grupo de variables que permiten identificar de forma adecuada el estado del proceso o detectar en forma temprana las perturbaciones. El capítulo 4 de esta tesis, se orienta a sistematizar el estudio de indicadores para dos aguas residuales (carbohidratos y proteína) realizando experimentos de estímulo-respuesta en planta piloto. Utilizando observaciones fenomenológicas y herramientas de la estadística como el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis factorial discriminante (FDA) en la selección de indicadores.

Finalmente en el capítulo 5, como un aporte a la monitorización y diagnóstico del arranque de nuevos reactores se presenta el estudio de los cambios en la ecología microbiana y en las características técnicas de una biomasa granular utilizada en la inoculación de dos tipos de reactores anaerobios (UASB y USBF), cuando se cambia de un sustrato simple a sustrato complejo o no acidificado.

1.4. Referencias

- Ahring B.K., Sanderberg M. and Angelidaki I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(3), 559-565.
- Angenent L.T., Sung S. and Raskin L.(2004). Formation of granules and *Methanosaeta* fibres in anaerobic migrating blanket reactor (AMBR). *Environmental Microbiology*, 6(4), 315-322.
- Archer D.B., Hilton M.G., Adams P. and Wiecko H. (1986). Hydrogen as a process control index in a pilot scale anaerobic digester. *Biotechnology Letters*, 8(3), 197-202.
- Batstone D.J. and Keller J. (2001). Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type. *Water Research*, 35(7), 1723-1729.
- Batstone D.J., Keller J. and Blackall L.L. (2004). The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water Research*, 38(6), 1390-1404.
- Björnsson L., Murto M., Jantsch T.G. and Mattiasson B. (2001). Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion. *Water Research*, 35(12), 2833-2840.
- Björnsson L., Murto M. and Mattiasson B. (2000). Evaluation of parameters for monitoring anaerobic co-digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 844-849.
- Burak D. and Yenigün O. (2006). Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, 97(10), 1201-1208.
- Castellano M., Ruiz-Filippi G., Gonzalez W., Roca E. and Lema J.M. (2007). Selection of variables using factorial discriminant analysis for the state identification of an anaerobic UASB-UAF hybrid pilot plant, fed with winery effluents *Water Science and Technology*, 56(2), 139-145.
- Chen C.L., Macarie H., Ramirez I., Olmos A., Ong S.L., Monroy O. And Liu W.T. (2004). Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate. *Microbiology*, 150, 3429-3440.
- Cloete T.E. and Muyima N.Y.O. ((1997). *Microbial community analysis: the key to the design of biological wastewater treatment systems*. IAWQ report. University Press, Cambridge, Great Britain.
- Cord-Ruwisch R., Mercz T.I., Hoh C-Y and Strong G.E. (1997). Dissolved hydrogen concentration as an on-line control parameter for the automated operation and optimization of anaerobic digesters. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(6), 627-634.
- Diaz E., Amils R., and Sanz J.L. (2003). Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *Water Science and Technology*, 48(6), 57-64.
- Dolfing J. (1986). Granulation in UASB reactors. *Water Science and Technology*, 18(12), 15-25.

- Fang H.H.P., Chui H.K. and Li Y.Y. (1994a). Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters. *Water Science and Technology*, 30(12), 87-96.
- Fang H.H.P., Chui H.K., Li Y.Y. and Chen T. (1994b). Performance and granules characteristics of UASB process treating wastewaters with hydrolyzed proteins. *Water Science and Technology*, 30(8), 55-63.
- Fang H.H.P., Chui H.K. and Li Y.Y. (1995). Microstructural analysis of UASB granules treating brewery wastewater. *Water Science and Technology*, 31(9), 129-135.
- Fang H.H.P. (2000). Microbial distribution in UASB granules its resulting effects. *Water Science and Technology*, 42(12), 201-208.
- Grotenhuis J.T.C., Smit M., Plugge C.M., Yuansheng X., van Lammeren A.A.M., Stams A.J.M. and Zehnder A.J.B. (1991). Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7), 1942-1949.
- Guiot S.R., Pauss A. and Costerton J.W. (1992). A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water Science and Technology*, 25(7), 1-10.
- Guwy A.J., Hawkes F.R., Hawkes D.L. and Rozzi A.G. (1997). Hydrogen production in a high rate fluidised bed anaerobic digester. *Water Research*, 31(6), 1291-1298.
- Harper S.R. and Pohland F. (1987). Enhancement of anaerobic treatment efficiency through process modification. *Journal WPCF*, 59(3), 152-161.
- Hawkes F.R., Guwy A.J., Hawkes D.L. and Rozzi A.G. (1994). On-line monitoring of anaerobic digestion: application of a device for continuous measurement of bicarbonate alkalinity. *Water Science and Technology*, 30(12), 1-10.
- Hickey R. and Switzenbaum, M. (1990) Behavior of carbon monoxide as a trace component of anaerobic digester gases and methanogenesis from acetate. *Environmental Science and Technology*, 24 (11): 1642-1648.
- Hickey R. and Switzenbaum, M. (1991). The response and utility of hydrogen and carbon monoxide as process indicators of anaerobic digesters subject to organic and hydraulic overloads. *Journal WPCF*, 63(2): 129-140.
- Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M. And Igarashi Y. (2006). Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1623-1630.
- Huang Y.H., Huang G.H., Chou S. and Cheng S.S. (2000). Hydrogen as a quick indicator of organic shock loading in UASB. *Water Science and Technology*, 42(3-4), 43-50.
- Hulshoff Pol L.W., de Castro Lopes S.I., Lettinga G. and Lens P.N.L. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, 38(6), 1376-1389.
- Jones R.M., MacGregor J.F., Murphy K.L. and Hall E.R. (1992). Towards a useful dynamic model of the anaerobic wastewater treatment process: a practical illustration of process identification. *Water Science and Technology*, 25(7), 61-71.

- Kuroda K., Silveira R.G., Nishio N., Sunahara H. And Nagai S. (1991). Measurement of dissolved hydrogen in an anaerobic digestion process by a membrane-covered electrode. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(6), 418-423.
- Lanthier M., Tartakovsky B., Villemur R., DeLuca G. and Guiot S.R. (2002). Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 4035-4043.
- Liu J., Olsson G. and Mattiasson B. (2004a). Control of anaerobic reactor towards maximum biogas production. *Water Science and Technology*, 50(11), 189-198.
- Liu J., Olsson G. and Mattiasson B. (2004b). Monitoring and control of an anaerobic upflow fixed-bed reactor for high-loading-rate operation and rejection disturbances. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(1), 43-53.
- Liu J., Olsson G. and Mattiasson B. (2006). Extremum-seeking with variable gain control for intensifying biogas production in anaerobic fermentation. *Water Science and Technology*, 53(4-5), 35-44.
- MacLeod F.A., Guiot S.R. and Costerton J.W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1598-1607.
- Mathiot S., Escoffier Y., Ehlinger F., Couderc J.P., Leyris J.P. and Moletta R. (1992). Control parameter variations in an anaerobic fluidised bed reactor subjected to organic shockloads. *Water Science and Technology*, 25(7), 93-101.
- Moletta R. (1989). Comparaison de la response de differents parametrrres a une surcharge organique d'un digesteur anaerobie. *Environmental Technology Letters*, 10, 173-184.
- Pauss A., Andre G., Perrier M. and Guiot S.R. (1990). Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes: inevitable transfer limitations of methane an hydrogen in the biomethanation process. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1636-1644.
- Pauss A. and Guiot S.R. (1993). Hydrogen monitoring in anaerobic sludge bed reactors at various hydraulic regimes and loading rates. *Water Environment Research*, 65(3), 276-280.
- Ripley L., Boyle W. and Converse J. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strenght wastes. *Journal WPCF*, 58(5), 406-411.
- Rodriguez J. (2006). Modelling anaerobic mixed culture fermentations. Tesis Doctoral, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos, Universidad Santiago de Compostela, España.
- Rocheleau S., Creer C., Lawrence J., Cantin C., Laramée L. and Guiot S. (1999). Differentiation of *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri* in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent in situ hybridization and confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2222-2229.
- Ruiz G. (2005). Monitorización y control avanzado de reactores anaerobios. Tesis Doctoral, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos, Universidad Santiago de Compostela, España.

- Saiki Y., Iwabuchi C., Katami A. and Kitagawa Y. (2002). Microbial analyses by Fluorescence *in situ* Hybridization of well-settled sludge in brewery wastewater treatment plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(6), 601-606.
- Sekiguchi Y., Kamagata Y., Nakamura K., Ohashi A. and Harada H. (1999). Fluorescence *in situ* hybridization using 16s rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3), 1280-1288.
- Slater W.R., Merigh M., Ricker N.L., Labib F. Ferguson J.F. and Benjamin M.M. (1990). A microcomputer-based instrumentation system for anaerobic wastewater treatment processes. *Water Research*, 24(1), 121-123.
- Spanjers H. And van Lier J.B. (2006), Instrumentation in anaerobic treatment – research and practice. *Water Science and Technology*, 53(4-5), 63-76.
- Steyer J.P., Bernard O., Batstone D.J. and Angelidaki I. (2006). Lessons learnt from 15 years of ICA in anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 53 (4-5), 25-33.
- Switzenbaum M.S., Giraldo-Gómez E. and Hickey R.F. (1990). Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. *Enzyme and Microbial Technology*, 12 (10), 722-730.
- Vanderhaegen B., Ysebaert E., Favere K., Van Wambeke M., Peeters T., Panic V., Vandelingenbergh V. and Verstraete W. (1992). Acidogenesis in relation to in-reactor granule yield. *Water Science and Technology*, 25(7), 21-30.
- van Lier J.B., Tilche A., Ahring B.K., Macarie H., Moletta R., Dohanyos M., Hulshoff Pol L.W., Lens P. and Verstraete W. (2001). New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 43(1), 1-18.
- Vanrolleghem P.A. and Lee D.S. (2003). On-line monitoring equipment for wastewater treatment processes: state of the art. *Water Science and Technology*, 47(2), 1-34.
- Whitmore T.N., Lazzari M. and Lloyd D. (1985). Comparative studies of methanogenesis in thermophilic and mesophilic anaerobic digesters using membrane inlet mass spectrometry. *Biotechnology Letters*, 7(4), 283-288.
- Whitmore T.N. and Lloyd D. (1986). Mass spectrometric control of the thermophilic anaerobic digestion process based levels of dissolved hydrogen. *Biotechnology Letters*, 8(3), 203-208.
- Whitmore T.N., Lloyd D., Jones G. and Williams T.N. (1987). Hydrogen-dependent control of the continuous anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 383-388.
- Zheng D., Angenent L.T. and Raskin L. (2006). Monitoring granule formation in anaerobic upflow bioreactors using oligonucleotide hybridization probes. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(3), 458-472.

Capítulo 2

Materiales y métodos

Resumen

En este capítulo se presentan los métodos analíticos y materiales utilizados transversalmente en el desarrollo del trabajo experimental. Los métodos analíticos se agrupan de acuerdo con la fase a que pertenecen: fase líquida, sólida o gaseosa. En el apartado de materiales se consigna la composición de las aguas residuales sintéticas y la descripción de la planta piloto anaerobia utilizada en la experimentación. Posteriormente, en los capítulos 3, 4 y 5, se presentarán los métodos analíticos y materiales usados específicamente en cada uno de los capítulos.

Los parámetros analizados en la fase líquida fueron Demanda Química de Oxígeno (DQO), Carbono Orgánico Total (TOC), pH, alcalinidad total y parcial, Ácidos Grasos Volátiles (AGV), Nitrógeno Inorgánico (NI) y Nitrógeno Total Kjeldhal (NTK). En la fase gas se analizó la composición del biogás (contenido en porcentaje de CH₄, CO₂, H₂S y N₂).

En la fase sólida se determinaron rutinariamente para la biomasa anaerobia los siguientes parámetros: concentración de Sólidos Totales (ST) y Sólidos Volátiles (SV), velocidad de sedimentación (Vs), Índice Volumétrico de Lodos (IVL), composición elemental, distribución por tamaño, densidad y las actividades específicas acidogénica (AAE) y metanogénica (AME) de la biomasa.

Las tres aguas sintéticas utilizadas, emulan las siguientes aguas residuales industriales:

- Agua residual rica en etanol similar a la generada en la fabricación de vinos y licores.
- Agua residual compuesta por hidratos de carbono, similar a la producida por las industrias del almidón y el azúcar.
- Agua residual con alto contenido de proteína, representando los efluentes de la industria de conservas de atún.

Índice

2.1. Métodos analíticos

2.1.1. Fase líquida

2.1.2. Fase gas

2.1.3. Fase sólida

2.2. Aguas residuales sintéticas

2.3. Planta piloto anaerobia

2.3.1. Reactor

2.3.2. Línea de agua

2.3.3. Línea de gas

2.3.4. Línea de información

2.3.5. Software de monitorización

2.3.6. Analizadores *on-line* y equipos auxiliares

2.4. Referencias

2.1. Métodos Analíticos

2.1.1. Fase Química

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se define como la cantidad de oxígeno equivalente ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) necesaria para oxidar químicamente todos los compuestos oxidables presentes en un agua residual. Para garantizar la oxidación de la materia orgánica se utiliza un agente oxidante fuerte (dicromato potásico) y se realiza la oxidación en medio ácido y a temperatura elevada ($150\text{ }^\circ\text{C}$).

Debido a la presencia de un mayor número de compuestos oxidables por vía química, generalmente la DQO de un agua residual es mayor que la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO). Para la mayoría de los compuestos orgánicos la DQO representa del 95 % al 100 % de la demanda teórica de oxígeno (Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 1992).

Se pueden obtener correlaciones entre la DQO y la DBO para un agua residual específica, lo cual permite utilizar la medida de la DQO en la monitorización y control de los procesos de depuración de aguas residuales; adicionalmente el cociente entre la DBO y la DQO es indicativo de la biodegradabilidad de los compuestos presentes en un agua residual particular.

El método aplicado en la determinación de la DQO es una variante del método 508 B del Standard Methods for the examination of water and wastewater (1985), desarrollada por Soto *et al.* (1989). En la determinación de la DQO se utilizaron las siguientes soluciones:

- Solución digestora, que se prepara disolviendo 10,216 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 33 g HgSO_4 en 500 mL de agua, a los que se añaden 167 mL de H_2SO_4 comercial y se completa el volumen a 1000 mL con agua destilada.
- Solución catalítica. Se añaden 10,7 g Ag_2SO_4 en 1000 mL de H_2SO_4 concentrado, dejando la mezcla en reposo durante dos días.
- Solución valorada de sulfato amónico ferroso (FAS). Se disuelven 13,72 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, a los que se añaden 20 mL de H_2SO_4 concentrado y posteriormente se completa a 1000 mL; esta solución se debe valorar con la solución patrón de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,05 N.
- Solución patrón de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,05 N.
- Solución de ferroína, 1,485 g de monohidrato de fenantrolina ($\text{C}_{18}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 0,695 g $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 100 mL de agua destilada.

Este método tiene validez dentro del rango de 90 a 900 $\text{mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo tanto la muestra a analizar se debe diluir si es necesario. Paralelamente al análisis

de las muestras debe prepararse un blanco utilizando agua destilada. Después de la digestión durante dos horas a 150 °C, se procede a valorar las muestras con la solución de FAS.

La normalidad del FAS utilizado en la valoración se determina de la siguiente manera: se añaden 3,5 mL de solución catalítica sobre 5 mL de agua destilada, se deja enfriar la muestra, añadiéndole luego 5 mL de solución patrón de dicromato y una gota del indicador de ferroína, la valoración de esta disolución se realiza con el FAS cuya normalidad se quiere determinar.

La concentración de DQO, expresada en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se calcula utilizando la Ecuación 2.1.

$$DQO(\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}) = ((B - A) \cdot N_{FAS} \cdot 8000) / V_m \quad (\text{Ec. 2.1})$$

Donde:

A : volumen de FAS consumidos por la muestra analizada (mL)

B : volumen de FAS consumidos en la valoración del blanco (mL)

V_m : volumen de muestra analizada (mL)

N_{FAS} : normalidad de la solución de FAS, que se puede calcular a partir de la Ecuación 2.2

$$N_{FAS} = V_{K_2Cr_2O_7} \cdot N_{K_2Cr_2O_7} / V_{FAS} \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Donde:

V_{FAS} : volumen de valoración de la solución de FAS (mL)

$V_{K_2Cr_2O_7}$: volumen añadido de solución patrón de $K_2Cr_2O_7$ (5 mL)

$N_{K_2Cr_2O_7}$: normalidad de la solución patrón de $K_2Cr_2O_7$ (0,05 N)

Carbono Orgánico Total (TOC)

El TOC es una medida más directa del contenido de materia orgánica total en un agua residual que la DQO. Sin embargo el TOC al no depender del estado de oxidación de la materia orgánica, no suministra la misma información que la DQO o la DBO. Por otra parte la determinación del TOC no incluye otros elementos presentes en la materia orgánica que pueden ser oxidados, como el nitrógeno o el hidrógeno, que contribuyen a la demanda de oxígeno evaluada por la DQO y la DBO.

La determinación del TOC es más rápida que la de DQO, aunque requiere un equipamiento más caro y complejo. Generalmente, para un agua residual específica, es posible establecer una correlación entre los datos de TOC y DQO (Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 1992).

La medida del TOC se fundamenta en el método 5310 B (Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 1992). Las determinaciones *off-line* de TOC se realizaron mediante un analizador Shimadzu TOC-5000, que calcula el TOC (átomos de carbono de enlace covalente en moléculas orgánicas) como la diferencia entre el Carbono Total (TC) y el Carbono Inorgánico (IC) (carbonato, bicarbonato, CO₂ disuelto). Se utiliza aire de alta pureza como gas portador a un caudal de 150 mL·min⁻¹.

El analizador determina el TC a partir del CO₂ que se produce durante la combustión catalítica de la muestra a 680 °C, empleando como catalizador de oxidación Platino inmovilizado sobre esferas de alúmina.

El IC se obtiene a partir del CO₂ que se libera al hacer pasar la muestra por una solución ácida de H₃PO₄ al 25 % (en estas condiciones ácidas todo el IC se convierte a CO₂). En ambos casos el CO₂ generado se enfría y deseca, posteriormente se conduce a un detector NDIR (Infrarrojo No Dispersivo) donde se cuantifica.

pH

El pH se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones H⁺, expresando la concentración de iones H⁺ en mol·L⁻¹, de acuerdo con la Ecuación 2.3.

$$pH = - \log[H^+] \quad (\text{Ec. 2.3})$$

Las concentraciones del ión H⁺ en soluciones acuosas varían generalmente entre 10⁻¹⁴ y 10⁰ mol·L⁻¹. Por lo tanto el valor del pH varía de 0 a 14, donde el valor de 7 indica una disolución neutra, valores menores a 7 indican soluciones ácidas y mayores que 7 indican soluciones básicas.

El control del pH es fundamental en el tratamiento anaerobio de aguas residuales. Los diferentes grupos de microorganismos involucrados en la digestión anaerobia mantienen actividad adecuada en el rango de pH de 6,8 a 7,5, siendo los microorganismos metanogénicos muy sensibles a los cambios del pH. A pH neutro los ácidos grasos volátiles (AGV) están mayoritariamente en forma ionizada; no obstante cuando el pH disminuye, los AGV se presentan parcialmente en forma no ionizada, que resulta más tóxica para los microorganismos metanogénicos (Zegers, 1987).

Las medidas de pH se realizaron utilizando un electrodo Crison Instruments, (cat. nº 52-02) equipado con un compensador automático de temperatura y conectado a un medidor de pH-mV (modelo nº 507). La sensibilidad del medidor es de ± 1 mV, que corresponde a 0,01 unidades de pH. Previamente se realiza un calibrado a 20 °C con dos disoluciones tampón estándar (Crison Instruments, S.A.) de pH 7,0 y pH 4,01.

Alcalinidad

La alcalinidad es un indicador de la capacidad que tiene un agua determinada de neutralizar ácidos y, por tanto, es muy útil en el control del pH (Speece, 1996). La alcalinidad es aportada por diferentes sustancias tampón, como sales y ácidos débiles. A pH próximos a los valores de neutralidad, los compuestos tampón más usuales son carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, pudiéndose encontrar también fosfatos, silicatos, boratos y otras bases (Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 1992). De esta manera el pH depende fundamentalmente de la capacidad tampón o alcalinidad del sistema (Ahring *et al.*, 1995).

La medida de la alcalinidad se puede usar como parámetro indicador de la estabilidad del proceso de degradación anaerobia. Un síntoma típico del funcionamiento anómalo de un reactor anaerobio es el incremento de la concentración de ácidos orgánicos y la correspondiente disminución de la alcalinidad bicarbonática, lo cual ocurre cuando la producción de dichos ácidos sobrepasa su consumo.

En el tratamiento anaerobio de aguas residuales se debe garantizar una capacidad tampón mínima del sistema del orden de $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para evitar posibles desestabilizaciones por la acumulación de ácidos orgánicos y disminución del pH en el sistema (Lema *et al.*, 1992).

La alcalinidad total (AT) determinada por valoración hasta pH 4,3, se puede considerar, aproximadamente como la suma de alcalinidad debida al bicarbonato y a los ácidos grasos volátiles. La alcalinidad parcial (AP) determinada hasta pH 5,75, corresponde a la alcalinidad del bicarbonato (Jenkins *et al.*, 1983). Mientras que la alcalinidad intermedia (AI), calculada como la diferencia entre las alcalinidades total (AT) y parcial (AP), representa en forma aproximada el aporte de alcalinidad debida a la concentración de AGV (Ripley *et al.*, 1986).

Varios autores han establecido que un parámetro adecuado para el control del proceso de digestión anaerobia es la relación entre las alcalinidades intermedia y total (AI/AT), recomendando para evitar la acumulación de ácidos orgánicos en el sistema, no superar el valor de 0,3 en dicha relación (Ripley *et al.*, 1986; Switzembbaum *et al.*, 1990; Soto *et al.*, 1993a; Wentzel *et al.*, 1994).

La determinación de la alcalinidad se realizó utilizando el método 2320.B de los Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (1992), que consiste en una valoración con H_2SO_4 (con normalidad conocida) a pH 5,75 (AP) y luego a pH 4,30 (AT). La muestra a analizar previamente se filtra o centrifuga para eliminar los sólidos suspendidos. Los valores de la alcalinidad están expresados en términos de $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, y se calculan de la siguiente manera:

$$AP = A \cdot N \cdot 5000 / V_m \quad (\text{Ec. 2.4})$$

$$AT = B \cdot N \cdot 5000 / V_m \quad (\text{Ec. 2.5})$$

Donde:

V_m : volumen de muestra (generalmente 25 mL)

N : normalidad de H_2SO_4

A : volumen de H_2SO_4 (mL) necesarios para llegar al punto de valoración pH 5,75

B : volumen de H_2SO_4 (mL) necesarios para llegar al punto de valoración pH 4,3

Ácidos Grasos Volátiles

Se clasifican como Ácidos Grasos Volátiles (AGV) los ácidos: acético, propiónico, i-butírico, n-butírico, i-valérico y n-valérico. En el proceso de digestión anaerobia los AGV son productos intermedios, provenientes de la acidificación de hidratos de carbono y de otras moléculas.

La acumulación de AGV en un reactor anaerobio refleja el desequilibrio cinético entre los procesos de producción y de consumo de estos ácidos (Switzenbaum *et al.*, 1990). Cuando los AGV se acumulan y el sistema no posee suficiente capacidad tampón, el pH disminuye y puede producirse la desestabilización y posterior acidificación del reactor.

La concentración de AGV se determinó mediante cromatografía gaseosa, empleando un cromatógrafo Hewlett Packard 5890A dotado con un detector de ionización de llama (FID), conectado a un inyector automático Hewlett-Packard 7673A. El rango de medida de concentración de AGV por este método es de 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para la separación de los AGV se utiliza una columna de vidrio rellena con Chromosorb WAW (malla 100/120) impregnado con NPGA 25 % y H_3PO_4 2 %. Las temperaturas del inyector, columna y detector fueron 105 °C, 260 °C y 280 °C, respectivamente.

Como gas portador se utilizó nitrógeno, saturado con ácido fórmico antes de entrar en el inyector, con un caudal de 24 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Como gases auxiliares se utilizaron aire e hidrógeno con caudales de 400 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Se usó como patrón interno el ácido trimetil acético (ácido piválico).

Nitrógeno Inorgánico (NI), Nitrógeno Total Kjeldhal (NTK) y Nitrógeno Total (NT)

El nitrógeno puede estar presente en las aguas residuales en varias formas; por orden decreciente de su estado de oxidación puede encontrarse como nitrato, nitrito, amonio y nitrógeno orgánico. Todas las formas de nitrógeno enunciadas, incluyendo el N_2 en forma gaseosa, pueden relacionarse bioquímicamente y forman parte del ciclo del nitrógeno (Franco; 2004).

El NTK comprende el nitrógeno orgánico (proteína, péptidos, urea, etc.) y el nitrógeno amoniacal. El NI corresponde a la suma de nitrito y nitrato. La suma del NTK y el NI da como resultado el nitrógeno total (NT) de la muestra.

El NI y el NT se determinaron en un analizador Rosemount-Dohrmann modelo DN-1900. El primer paso consiste en valorar el nitrógeno total (NT) de la muestra a partir del óxido nítrico (NO) producido mediante la combustión catalítica (utilizando cobre como catalizador) a 850 °C. Posteriormente se mide el NI a partir de la reducción química a NO con H₂SO₄ utilizando como catalizador VCl₃ en medio ácido y a 80 °C.

El NO generado en estas dos reacciones se seca y se hace reaccionar con O₃, para obtener NO₂, compuesto inestable; cuando este compuesto vuelve al estado anterior (NO) se produce la emisión de protones en forma proporcional a la cantidad de NO y por lo tanto proporcional a la masa de nitrógeno presente en la muestra.

2.1.2. Fase Gaseosa

A pH neutro y sin acumulación de AGV en la fase líquida, la composición del biogás depende de la composición del agua residual tratada. La digestión anaerobia de materia orgánica genera CH₄ y CO₂, que son los compuestos de carbono más reducido y más oxidado respectivamente y sus proporciones en el biogás dependen del estado de oxidación del carbono en la materia orgánica original; cuanto más reducido esté el carbono presente en el sustrato, mayor será la proporción de CH₄ en el biogás (Lema *et al.*, 1992; Angelidaki y Sanders, 2004). La Tabla 2.1 muestra los porcentajes teóricos de CH₄ para los componentes típicos de las aguas residuales.

Tabla 2.1. Porcentaje teórico de CH₄ para componentes típicos de las aguas residuales

Tipo de sustrato	Composición	Contenido en CH ₄ (%)
Carbohidratos	(C ₆ H ₁₀ O ₅) <i>n</i>	50
Proteínas	C ₅ H ₇ NO ₂	50
Lípidos	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	70
Etanol	C ₂ H ₆ O	75
Acetato	C ₂ H ₄ O ₂	50
Propionato	C ₃ H ₆ O ₂	58

Por otro lado, el pH y los cambios en la alcalinidad juegan un papel determinante en la concentración de CO₂ en la fase líquida y por lo tanto en la composición del biogás. La relación CH₄/CO₂ en un reactor sin cambio en la composición del sustrato puede utilizarse como indicador del estado del proceso,

puesto que un aumento en la proporción de CO₂ en la fase gaseosa generalmente esta relacionado con el aumento de la concentración de AGVs en la fase líquida y su consiguiente neutralización por parte de la alcalinidad disponible. Dichos cambios anuncian la posibilidad de acidificación del sistema (Soto *et al.*, 1993a).

El análisis de la composición del biogás se lleva a cabo mediante cromatografía gaseosa utilizando el método 2720.C (Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 1992). La determinación se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 serie II dotado de detector de conductividad térmica. Las temperaturas del inyector, columna y detector son 110 °C, 35 °C y 110 °C, respectivamente. El gas de arrastre es helio con un caudal de 16 mL·min⁻¹. Se inyecta 1 mL de muestra con una jeringuilla a través de un septum colocado en la parte superior del cromatógrafo.

2.1.3. Sólidos

Sólidos Totales (ST) y Sólidos Volátiles (SV)

Los sólidos presentes en la biomasa pueden tener naturaleza orgánica e inorgánica, generalmente se utiliza el contenido de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) como medida indirecta de la biomasa presente.

En este trabajo teniendo en cuenta el bajo contenido relativo de sólidos disueltos respecto a los sólidos suspendidos tras realizar un lavado cuidadoso de la muestra, se optó por utilizar los sólidos volátiles (SV) como medida de la biomasa presente en el lodo anaerobio (SSV) y los sólidos totales (ST) como medida de los sólidos suspendidos totales (SST). La determinación de ST y SV se realizó por triplicado.

Los ST se determinan agregando a un crisol previamente pesado un volumen conocido de muestra (generalmente 10 mL), sometiendo la muestra a secado en estufa a 103 – 105 °C. La diferencia de peso entre el crisol vacío y el crisol con la muestra seca permite calcular el contenido en ST (Método 2540 B, Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 1992).

Los SV se determinan mediante la calcinación, a alta temperatura (550 °C) en una mufla (Selecta), de la muestra previamente sometida a secado. Los SV se determinan por diferencia de peso antes y después de la calcinación. El material volátil esta compuesto casi en su totalidad por sólidos orgánicos puesto que sólo una pequeña cantidad de algunas sales minerales se descomponen y volatilizan a esa temperatura (Método 2540 E, Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 1992).

Velocidad de Sedimentación (V_s)

Los reactores anaerobios de tercera generación presentan como una característica fundamental su capacidad de retener grandes cantidades de biomasa, haciendo que el tiempo de retención de sólidos sea mucho mayor que el tiempo de retención hidráulico. En los reactores de lecho suspendido la retención de biomasa se logra al obtener gránulos anaerobios con velocidades de sedimentación mayores que $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

El ensayo para determinar la V_s se realiza generalmente con muestras de biomasa anaerobia a las que se ha aplicado una dilución de 1:5. El ensayo se realiza en una probeta de 1000 mL, con diámetro y altura conocidos. Se adicionan 200 mL de la muestra de lodo en la probeta, completando a 1000 mL con efluente del reactor. Luego se homogeneiza por agitación el contenido de la probeta. Inmediatamente se miden y registran el tiempo y la altura de la interfase lodo-agua a intervalos cortos de tiempo hasta que termine de sedimentar.

Se representan los resultados en un gráfico de altura de la interfase frente a tiempo, trazando por último la tangente a la zona de la curva con mayor pendiente, la velocidad de sedimentación se calcula en $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ a partir de la pendiente de la línea tangente.

Índice Volumétrico de Lodos (IVL)

El IVL es una medida de la capacidad de compactación que tiene un lodo (volumen ocupado por unidad de masa). Cuanto menor sea el volumen ocupado por un lodo sedimentado, menor será la demanda de tamaño de las unidades de sedimentación. El IVL se define como el volumen en mL ocupado por 1 g de sólidos suspendidos totales (SST) del lodo estudiado (Método 2710-D, Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 1992).

Para hacer el ensayo de determinación del IVL usualmente se usa el mismo lodo que se ha utilizado en el ensayo de velocidad de sedimentación. El lodo se coloca en una probeta graduada y se deja sedimentar durante 30 min. Al finalizar dicho tiempo se registra el volumen ocupado por el lodo sedimentado. El IVL, expresado en $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1} \text{ SST}^{-1}$, se calcula utilizando la Ecuación 2.6. Se utilizan los sólidos totales (ST) presentes en la muestra como medida de los sólidos suspendidos totales (SST).

$$IVL = V_{30\text{min}} / (C_{SST} \cdot V \cdot F) \quad (\text{Ec. 2.6})$$

Donde:

$V_{30\text{min}}$: volumen ocupado por la muestra al fin de 30 min (mL)

C_{SST} : concentración de sólidos suspendidos totales de la muestra utilizada en el ensayo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

V : Volumen de la probeta (L)

F : factor de dilución utilizado en el ensayo (0,2)

Distribución por tamaño

Utilizando una técnica de análisis de imágenes (Syutsubo *et al.*, 2001; Jeison and Chamy, 1998) se realizó el seguimiento de la distribución de tamaño de los gránulos, considerando una muestra de 200 a 300 gránulos.

El procedimiento es el siguiente: se colocan en una placa Petri aproximadamente de 20 a 30 gránulos previamente lavados, agregando agua destilada hasta cubrir totalmente los gránulos para evitar zonas de brillo en las fotos. La fotografías se toman con una cámara digital (CoolSNAP, Roper Scientific Photometrics), combinada con un estereoscopio (Stemi 2000-C, Zeiss), utilizando el software Image-Pro Plus para la adquisición de las imágenes. En la Figura 2.1 se presenta una imagen típica de los gránulos.

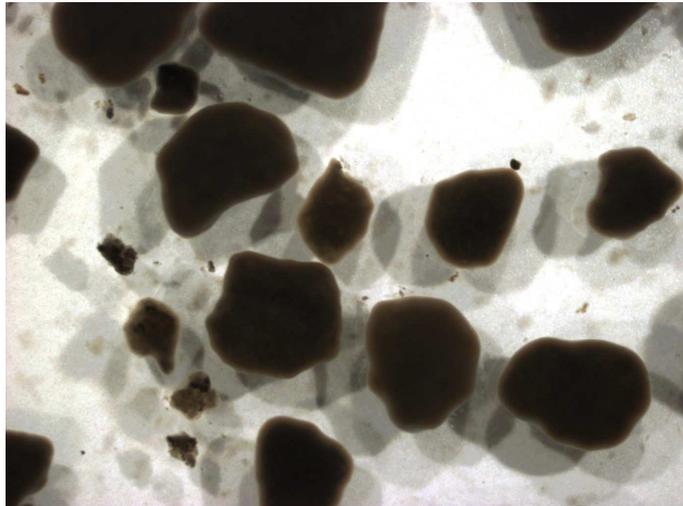


Figura 2.1. Fotografía de la biomasa granular

Posteriormente mediante el software RS Image fueron analizadas las imágenes, cuantificando los siguientes parámetros morfométricos: área, aspecto, esfericidad y diámetro "feret". El diámetro "feret" se calcula promediando los segmentos más corto y más largo del gránulo, tal y como se ilustra en la Figura 2.2. Se clasificaron como gránulos las partículas con diámetro mayor a 0,1 mm.

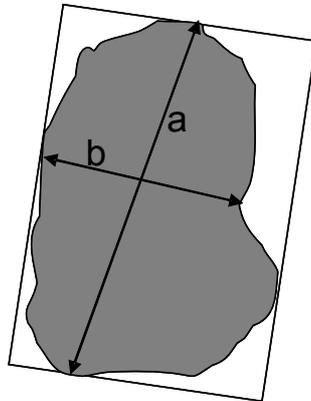


Figura 2.2. Cálculo del diámetro "feret", segmento más largo (a) y más corto (b) del gránulo.

La información obtenida se procesa utilizando una hoja de cálculo en Excel, dando como resultado la distribución por tamaño en número de gránulos y en volumen de gránulos (considerando gránulos esféricos para esta distribución). La Figura 2.3 presenta un ejemplo de la distribución en número y en volumen.

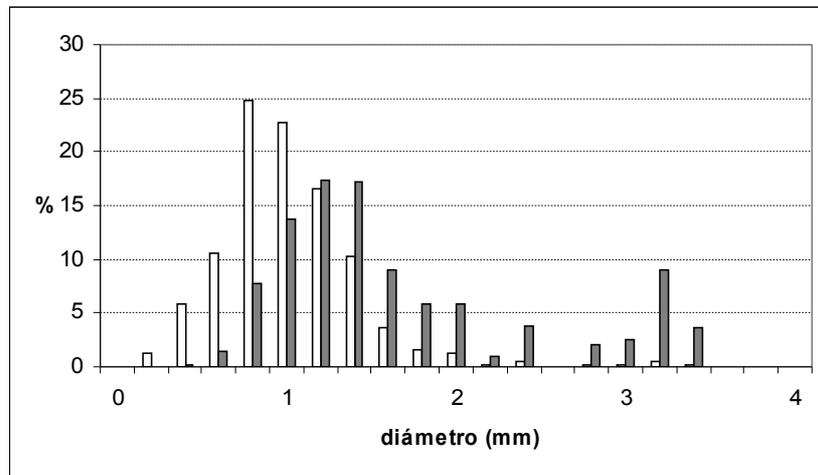


Figura 2.3. Ejemplo de distribución en número (□) y en volumen (■) por diámetro de los gránulos.

Densidad de los gránulos

La densidad de los lodos granulares ($\text{g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ lodo) indica el grado de compactación de los gránulos y esta relacionada con otras características como la

velocidad de sedimentación y el índice volumétrico de lodos. Para determinar la densidad de la biomasa granular se utilizó el método descrito por Beun *et al.* (2002). El procedimiento se presenta a continuación.

Se retira una muestra del reactor colocándola en una probeta, se mezcla bien y se deja sedimentar, retirando luego el sobrenadante. A la biomasa sedimentada se le añade una cantidad conocida de solución de azul de dextrano de concentración $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, en una proporción de volumen de aproximadamente 1:1. La mezcla se agita y se deja sedimentar la biomasa. Se retira el sobrenadante y conjuntamente con la solución original de azul de dextrano se analizan por espectrofotometría a 620 nm.

Debido a que el azul de dextrano es una macromolécula y no penetra en la biomasa, es posible relacionar la disminución en la absorbancia de la muestra de azul de dextrano con la fracción de agua presente y por lo tanto calcular el volumen ocupado por la biomasa. Se asume que la densidad de la solución de azul de dextrano es igual a la densidad del agua. Posteriormente se determinan los SSV de la muestra.

La densidad de la biomasa se calcula usando la siguiente expresión:

$$\text{Densidad} = V_{\text{inicial}} \cdot C_{\text{SSV}} / V_{\text{biomasa}} \quad (\text{Ec. 2.7})$$

Donde:

C_{SSV} : concentración de sólidos suspendidos volátiles de la muestra ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

$$V_{\text{inicial}} = P_2 - P_1$$

$$V_{\text{biomasa}} = P_4 - P_1 - V_L$$

P_1 : peso de la probeta vacía

P_2 : peso de la probeta vacía con la muestra del reactor

P_4 : peso de la probeta luego de agregar el azul de dextrano

V_L se calcula con la siguiente ecuación:

$$V_L = A_{\text{inicial}} \cdot V_{\text{azul de dextrano}} / A_{\text{final}} \quad (\text{Ec. 2.8})$$

Donde:

A_{inicial} : absorbancia de la solución de azul de dextrano $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

A_{final} : absorbancia del líquido sobrenadante de la muestra

$$V_{\text{azul de dextrano}} = P_4 - P_3$$

P_3 : peso de la probeta vacía con la muestra del reactor tras retirar el sobrenadante

Actividad Metanogénica Específica (AME)

La actividad metanogénica específica es una medida de la velocidad de conversión de DQO a metano por unidad de biomasa y se puede expresar en g DQO-CH₄:g SSV⁻¹·d⁻¹. Para sustratos fácilmente fermentables se considera que la metanogénesis es la etapa limitante, por lo tanto la AME permite evaluar la actividad máxima de la biomasa para un sustrato determinado (Soto *et al.*, 1993b; Jawed and Tare, 1999).

Los ensayos de actividad de la biomasa se basan en la medición de uno o varios productos de la reacción biológica en estudio o en la tasa de disminución del sustrato (Angelidaki y Sanders, 2004). En este trabajo se realizó el seguimiento de la AME midiendo la producción de metano a partir de diferentes sustratos: etanol, acetato y la mezcla gaseosa H₂/CO₂ (4:1).

El ensayo se realizó por triplicado para cada sustrato en viales de 122 mL, dotados de tapón y sello de aluminio (para evitar fugas de biogás o entradas de aire). Se mantuvo una concentración de biomasa de 1,5 a 2,5 g SSV·L⁻¹ (Guiot, 1991; Soto *et al.*, 1993b) y una relación sustrato/biomasa de 1 a 2 g DQO·g SSV⁻¹. Se utilizó como medio de cultivo, una modificación del propuesto por Angelidaki y Sanders (2004). La Tabla 2.2 presenta las concentraciones de macro y micro nutrientes en el medio utilizado.

Tabla 2.2. Composición del medio de cultivo utilizado en los ensayos de determinación de la actividad metanogénica específica (AME)

Elemento	Compuesto	Concentración en mg·L ⁻¹
N	NH ₄ Cl	570
P	KH ₂ PO ₄	420
Mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O	96
Ca	CaCl ₂	8
Fe	FeCl ₂ ·4H ₂ O	2
Co	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,4
Mn	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,6
Cu	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,03
B	H ₃ BO ₃	0,06
Mo	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,07
Se	Na ₂ SeO ₃	0,07
Ni	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,09
Zn	ZnCl ₂	0,05

Adicionalmente se agregan por cada litro de medio: 0,3 g de extracto de levadura y 1 mL de solución de resazurina al 0,1 % como indicador de anaerobiosis. El medio se hierve para desalojar el oxígeno y tras enfriarlo se

agregan 0,5 g de cisteína (agente reductor), 2 g de NaHCO₃ (agente tampón) por litro de medio y se ajusta el pH a 7. Se envasan 38 mL de medio en cada vial y se agrega la biomasa, gaseando por lo menos durante un minuto con la mezcla gaseosa N₂/CO₂ (4:1), posteriormente se cierran y sellan los viales.

Se agregan a cada vial 0,5 mL de la solución Na₂S·9H₂O (4 g·L⁻¹) como agente reductor y se procede a purgar el espacio de cabeza de los viales durante un minuto con la mezcla gaseosa N₂/CO₂ mencionada anteriormente. Los viales se dejan durante una noche en incubadora a 37 °C y con agitación de 100 rpm con el fin de compensar presiones y temperatura. Posteriormente se purgan las botellas y se procede a agregar el sustrato correspondiente: 1,09 mM de etanol, 0,73 mM de acetato ó la mezcla gaseosa H₂/CO₂ (4:1) a una presión de 100 kPa. Para cada tipo de lodo se realiza por triplicado un control al cual no se le agrega sustrato, que permite estimar la producción de metano a partir del sustrato presente inicialmente en el lodo.

Las botellas se colocan en incubadora a 37 ± 2 °C y con agitación de 100 rpm para evitar limitaciones por transferencia de materia. Periódicamente se analiza una muestra de 1 mL de biogás por cromatografía de gases, estimando la masa de CH₄ en el espacio de cabeza utilizando un calibrado previo, tal como se muestra en la Figura 2.4.

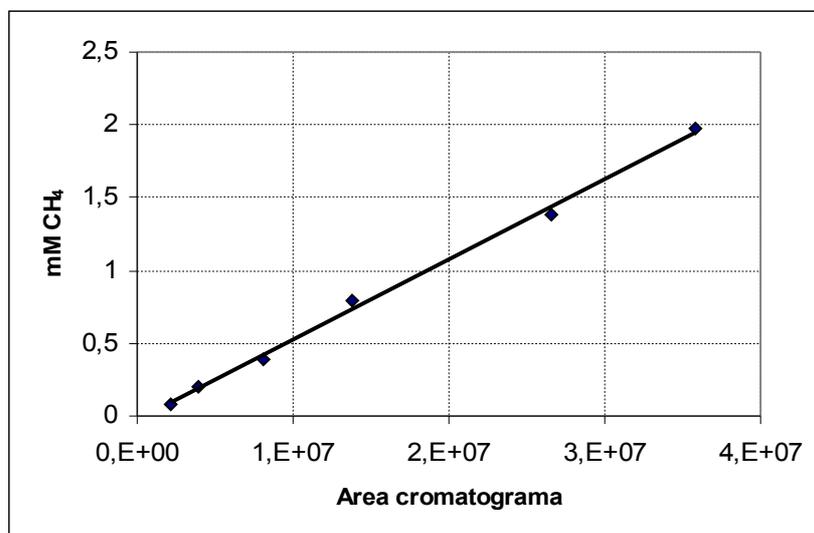


Figura 2.4. Calibrado en mM de CH₄ en función del área del cromatograma de CH₄; $mM\ CH_4 = 6 \cdot 10^{-5} (\text{área del cromatograma}) - 0,029$; con coeficiente $R^2 = 0,997$

La AME se calcula utilizando la Ecuación 2.9 a partir de la velocidad máxima de producción de metano (pendiente máxima de la curva que representa la masa neta de metano acumulada en función del tiempo) tras ser corregida por la producción

del ensayo de control. Una vez consumido aproximadamente el 80 % del sustrato (contabilizado mediante la masa de CH₄ acumulada) se procede a realizar una segunda alimentación.

$$AME = P(CH_4)_{\max} \cdot 24 \cdot 0,064 / SSV \quad (\text{Ec. 2.9})$$

Donde:

AME : actividad metanogénica específica (g DQO-CH₄·g SSV⁻¹·d⁻¹)

P(CH₄)_{max} : pendiente máxima de generación de metano (mM CH₄·h⁻¹)

SSV : sólidos suspendidos volátiles en cada botella (g SSV)

24 es el factor para pasar de horas a días

0,064 es el factor para convertir mM CH₄ a g DQO

Actividad Acidogénica Específica (AAE)

La actividad acidogénica específica mide la velocidad de producción de ácidos grasos volátiles por unidad de biomasa a partir de glucosa como sustrato. La AAE se puede expresar como g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹. En la determinación de la AAE se utilizó el mismo medio de cultivo empleado para la AME, descrito en el apartado anterior. El procedimiento es similar, diferenciándose en que el sustrato utilizado es glucosa y el seguimiento de la actividad se realiza a través de la tasa de desaparición del sustrato, el ensayo tiene una duración de entre 24 y 36 horas debido a que la glucosa se degrada a AGV en aproximadamente 12 horas (Elias *et al.*, 1999).

El ensayo se realizó por triplicado en viales de 122 mL. Se mantuvo una concentración de biomasa de 1,5 a 2,5 g SSV·L⁻¹ (Guiot, 1991; Soto *et al.*, 1993b) y una concentración de glucosa de 1,5 g DQO·L⁻¹. Los ensayos se realizaron a 37 ± 2 °C y agitación de 100 rpm. Luego de agregar la glucosa, se extraen en forma periódica muestras de aproximadamente 1 mL de líquido, que se centrifugan a 15.000 rpm durante 5 min y a partir del sobrenadante se analiza la concentración de glucosa mediante la reacción con el ácido 3,5 dinitro-salicílico (DNS), según el método descrito por Miller (1959) y modificado por Ghose (1987).

El contenido en glucosa se determina añadiendo 0,5 mL de la muestra a analizar y 0,5 mL del reactivo DNS en un tubo de vidrio; se sumerge la mezcla anterior durante 5 minutos en agua en ebullición para que se desarrolle la reacción y luego se realiza un enfriamiento rápido. Luego se adicionan 5 mL de agua destilada y a continuación se lee la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603. La concentración de glucosa se determina utilizando una recta de calibrado previamente construida con patrones de glucosa con concentraciones entre 0 y 2 g·L⁻¹. Una vez que la glucosa es consumida se realiza la segunda alimentación de la misma forma que la primera. La AAE se calcula a partir de la velocidad de degradación del sustrato, o sea de la pendiente máxima de la

curva que representa la concentración de glucosa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en función del tiempo (en horas).

$$AAE = P(\text{Glucosa})_{\max} \cdot 24 \cdot 1,067 / SSV \quad (\text{Ec. 2.10})$$

Donde:

AAE : actividad acidogénica específica ($\text{g DQO}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)

$P(\text{Glucosa})_{\max}$: pendiente máxima de consumo ($\text{g glucosa consumida}\cdot\text{h}^{-1}$)

SSV : sólidos suspendidos volátiles en cada botella (g SSV)

24 es el factor para pasar de horas a días

1,067 es el factor para convertir g de glucosa en g de DQO

Composición elemental de la biomasa

La técnica de análisis elemental permite la cuantificación del contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno presente en la biomasa anaerobia. La técnica se basa en la oxidación (combustión) completa de la muestra y posterior análisis de los gases producidos. El procedimiento de análisis es el siguiente: las muestras pesadas son encapsuladas en metal (estaño para CHNS o plata para O); luego se introducen en la zona de combustión a una temperatura superior a 1000°C en presencia de oxígeno. Los gases que se producen en la combustión se hacen pasar a través de un reactor catalítico que completa la oxidación total de los elementos a determinar.

El carbono se convierte cuantitativamente a dióxido de carbono, el hidrógeno a agua y el nitrógeno a óxidos de nitrógeno. Un tubo de reacción secundario elimina el exceso de oxígeno y reduce los óxidos de nitrógeno a nitrógeno antes de que los gases entren en la columna de cromatografía gaseosa donde se separan y detectan. La señal registrada se relaciona con la cantidad de elemento en el puerto de entrada y por comparación con patrones; el resultado se obtiene como un porcentaje.

Composición de la fracción mineral de la biomasa

El análisis de la composición de la fracción mineral de la biomasa se realizó utilizando la técnica de espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF). El equipo utilizado consta de un generador de alto voltaje, una fuente emisora de rayos X y un detector. La espectrometría de fluorescencia de rayos X permite identificar y cuantificar los elementos químicos presentes en una muestra de un modo rápido, preciso y prácticamente sin necesitar ningún pretratamiento. El valor que se obtiene es el contenido total sin tener en cuenta el estado químico del elemento (oxidación, tipo de enlaces, estructura cristalina). Los elementos que se pueden detectar con esta técnica en el equipo utilizado son los comprendidos entre magnesio (Mg) y uranio (U).

2.2. Aguas sintéticas

Tanto en planta piloto como en los reactores a escala de laboratorio se utilizaron los mismos sustratos: disoluciones de etanol, hidratos de carbono y proteína hidrolizada, emulando de esta manera los componentes principales de las aguas residuales ricas en etanol, hidratos de carbono y proteína respectivamente. Las materias primas utilizadas como sustrato se presentan en la Tabla 2.3, fueron seleccionadas bajo tres criterios principales: disponibilidad comercial, bajo coste y fácil preparación.

Tabla 2.3. Características de las materias primas utilizadas en la preparación de las aguas residuales sintéticas

Sustrato Tipo	Fabricante	Producto	Relación DQO/Sustrato	Relación TOC/Sustrato	Relación DQO/TOC
Etanol	Bodegas Orense S.L.	Vino blanco, contenido de etanol aproximado del 11%	0,20 gDQO·mL ⁻¹	0,05 gDQO·mL ⁻¹	4,0
Hidratos de carbono	CERESTAR IBERICA S.L.	Dextrina (cadenas de 6-8 glucosas)	1,08 gDQO·g ⁻¹	0,42 gDQO·g ⁻¹	2,6
Proteína hidrolizada	JUNCA	Proteína hidrolizada 80-90 % de proteína de origen animal	1,01 gDQO·g ⁻¹	0,44 gDQO·g ⁻¹	2,3

El aporte de macro y micro nutrientes, tanto para los experimentos en reactores de laboratorio como en planta piloto, se realizó adicionando productos utilizados en la agricultura. En la Tabla 2.4 se indica cada nutriente y las características del producto utilizado para suministrarlo.

Las relaciones DQO/Bicarbonato/N/P utilizadas en las aguas residuales sintéticas tipo etanol y tipo hidratos de carbono son respectivamente: 1000/400/7/1 y 600/400/7/1 (Speece, 1996). Para el agua residual tipo proteína hidrolizada no se agregó nitrógeno ni bicarbonato y se utilizó una relación DQO/P de 600/1.

Los micronutrientes como potasio, magnesio y elementos traza se dosificaron de acuerdo con las concentraciones establecidas en la preparación del medio utilizado en el ensayo de la actividad metanogénica específica (AME) (ver Tabla 2.2).

Tabla 2.4. Características de los productos utilizados como macronutrientes, micronutrientes y alcalinizantes

Macro y micro nutrientes	Producto	Nombre comercial	Fabricante
Nitrógeno	Cloruro de Amonio	Cloruro de Amonio	BASF
Fósforo	Fosfato disódico cristalizado	Fosfato disódico cristalizado	BK Giuliani
Bicarbonato	Bicarbonato de sodio	Bicarbonato de sodio	Solvay Química S.A.
Potasio	Nitrato potásico, potasio total 38%	KristaK	Yara
Magnesio	Mg 2,5%	Welgro magnesio	Masso, División Agro
Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo	Mezcla de elementos traza	Welgro micromix	Masso, División Agro

2.3. Planta Piloto Anaerobia

A continuación se presenta una descripción general de la planta piloto de tratamiento anaerobio de aguas residuales utilizada durante la elaboración del trabajo experimental. En su descripción se diferenciarán cuatro componentes: reactor, línea de agua, línea de gas y línea de información. La Figura 2.5 presenta una visión general de la planta.



Figura 2.5. Fotografía general de la planta piloto

2.3.1. Reactor

El reactor es un híbrido USBF (UASB+AF) de 1,15 m³ de volumen útil (Fernandez, 1994; Fernandez *et al.*, 2001; Ruiz, 2005) cuyo detalle se puede ver en la Figura 2.6. Está construido en acero inoxidable y tiene geometría cilíndrica con diámetro interno de 0,8 m. El reactor posee un anillo de distribución de la alimentación en la parte inferior con 3 puntos de alimentación lateral y uno central en el fondo del reactor. Para la toma de muestras de biomasa el reactor cuenta con cuatro puertos localizados desde el fondo del reactor a 0,50; 0,84; 1,20 y 1,52 m respectivamente. La zona UASB esta ubicada en la parte inferior del reactor, y tiene un volumen de 0,85 m³ (74 % del volumen total). En la parte superior de la zona UASB está localizada una sonda que registra la temperatura dentro del reactor.

Sobre la zona UASB se encuentra el filtro anaerobio (AF), compuesto por anillos de PVC de 50 mm de diámetro por 50 mm de largo, dispuestos al azar y soportados mediante una rejilla. El volumen del filtro es 0,3 m³ (26 % del volumen total) con una porosidad del 96 % (0,288 m³ de volumen útil). Finalmente el espacio de cabeza del reactor es de 0,8 m³.

La zona del UASB y del filtro posee doble pared para el aislamiento térmico de la zona de reacción, mientras que la zona superior posee un revestimiento de lana de vidrio para su aislamiento. Como mecanismo de seguridad frente al aumento de presión en la cabeza del reactor por obstrucción de la línea de gas, el espacio de cabeza del reactor está conectado a un sello hidráulico de 250 cm de altura.

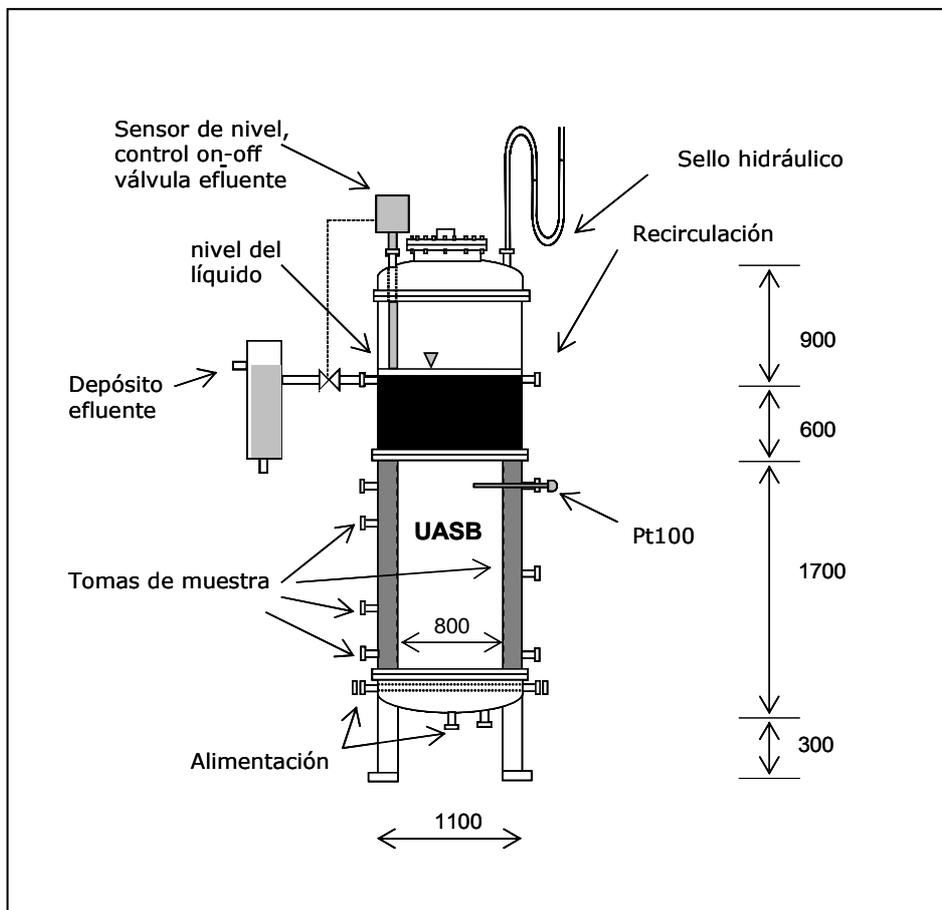


Figura 2.6. Esquema del reactor híbrido y sus dimensiones principales en mm. Se pueden apreciar las zonas UASB, filtro y el espacio de cabeza; la entrada y salida del efluente y del biogás y el sistema de control de nivel (sensor y válvula).

2.3.2. Línea de agua

El sistema de preparación del agua residual en línea consta de tres bombas: bomba de dosificación de sustrato (Milton Roy-Dosapro modelo LMI-CEA963-368SM), bomba de dosificación de nutrientes (Milton Roy-Dosapro modelo G-A) y bomba de agua de dilución (Timsa modelo CP1 38 P). Las tres bombas se manipulan independientemente de modo que se pueden variar las concentraciones de sustrato y de nutrientes en la alimentación dependiendo de las necesidades específicas de cada experimento.

La solución de nutrientes se prepara y almacena en un tanque de 500 L provisto de un agitador para realizar la mezcla de las sales y productos utilizados. El caudal del agua de dilución se controla mediante un caudalímetro electromagnético, marca ABB modelo COPA-XE DE43W. La dosificación de nutrientes y el sustrato correspondiente se realiza ajustando el caudal de las bombas de acuerdo a una curva de calibrado (mA frente a caudal) específica para cada bomba. Las tres líneas se combinan y pasan a través un mezclador estático de volumen 1 L (Figura 2.7). Luego se determina y registra el pH de entrada e inmediatamente después hay una toma de muestra para analizar tanto el carbono orgánico total (TOC) como el carbono inorgánico total (TIC) de la alimentación.

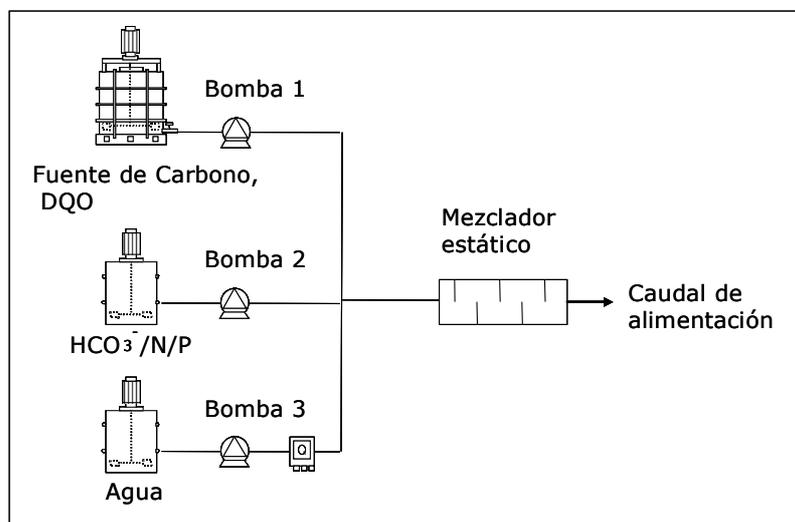


Figura 2.7. Esquema del sistema de preparación de la alimentación en línea.

El control de temperatura (37 ± 2 °C) y la velocidad ascensional del líquido ($0,5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) dentro del reactor se logran a través de recirculación, utilizando una bomba de membrana (Milton Roy-Dosapro modelo F-400 N-3). Para evitar la

succión de gas se toma la recirculación 10 cm por debajo de la salida del efluente del reactor. El control de sólidos gruesos se realiza mediante un filtro en línea, localizado inmediatamente antes de la bomba de recirculación, dicho filtro retiene los sólidos con diámetro mayor a 1 mm.

Antes de calentar el flujo de recirculación, se determina su caudal mediante un caudalímetro electromagnético (Siemens modelo 7ME2531) y su pH a través de un electrodo marca ISI. Se asume que el pH de la línea de recirculación es igual al pH del efluente del reactor. Luego la recirculación pasa por un intercambiador de calor de doble tubo, construido en acero inoxidable, dispuesto en corriente directa, con el agua de proceso por el tubo, mientras que el agua caliente, impulsada por una bomba centrífuga (Roca modelo MYL-030), circula por la zona anular.

Un calentador eléctrico (Termo modelo CN-100) conectado en circuito cerrado suministra el agua caliente al intercambiador de calor. Además el agua de dilución se precalienta mediante una resistencia eléctrica de 1000 W hasta una temperatura aproximada de 35 °C.

Tras pasar por el intercambiador de calor, se mezcla la recirculación con la alimentación, midiendo luego la temperatura de entrada al reactor mediante una sonda Pt100. La alimentación del reactor se realiza mediante un anillo de distribución con 3 entradas tangenciales además de una entrada de fondo, con el objeto de asegurar una distribución homogénea sobre toda la sección transversal del reactor.

La salida del efluente se realiza por gravedad y se controla por medio de un sensor de nivel situado en el interior del reactor, en el espacio de cabeza, que actúa sobre una válvula *on-off* que permite la salida de efluente. De este modo se logra mantener un nivel constante dentro del reactor independientemente de los cambios de presión que suceden cuando se producen incrementos en la producción de gas, en los experimentos de sobrecarga.

El efluente se recoge por un anillo externo con 3 puntos de toma. Posteriormente se almacena en un depósito de 2 L de volumen útil y desde este sale por rebose a la red de desagüe. El depósito de almacenamiento de efluente permite la toma de muestra para el análisis de TOC/TIC del efluente y el filtrado de efluente para la determinación de carbono orgánico disuelto (DOC), carbono inorgánico disuelto (DIC), AGV y Alcalinidad Bicarbonática del efluente.

2.3.3. Línea de gas

El biogás producido abandona el reactor por la parte superior y pasa por dos trampas de vapor de agua conectadas en serie y posteriormente se divide en dos corrientes. Una de las corrientes se conduce al sensor de metano y monóxido de

carbón (Siemens modelo Ultramat 22P) con un caudal de $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Este sistema de medición no es invasivo, de modo que este caudal de biogás retorna al espacio de cabeza del reactor una vez analizado.

La segunda corriente pasa por el caudalímetro másico (Rosemount modelo 5860i). A la salida del caudalímetro másico la línea se divide en dos: por una se elimina el biogás al exterior y por la otra se succiona el biogás hacia el sensor de hidrógeno (Sensotrans modelo sensotox 420). La succión al sensor de hidrógeno es intermitente, ya que este mide solo 5 minutos cada 30 minutos. Esta metodología es invasiva, por lo que durante los 5 minutos de medición se purga el gas analizado a la atmósfera. En la cabeza del reactor se encuentra localizado un medidor de presión (Siemens, modelo TMF1563) con un rango de medida de 0 a 1,6 bar. Para la configuración actual del reactor (nivel constante), los valores de presión de cabeza presentan una buena correlación con el caudal de biogás (ver Figura 2.8), por tanto la medida de presión puede utilizarse para estimar el caudal de biogás.

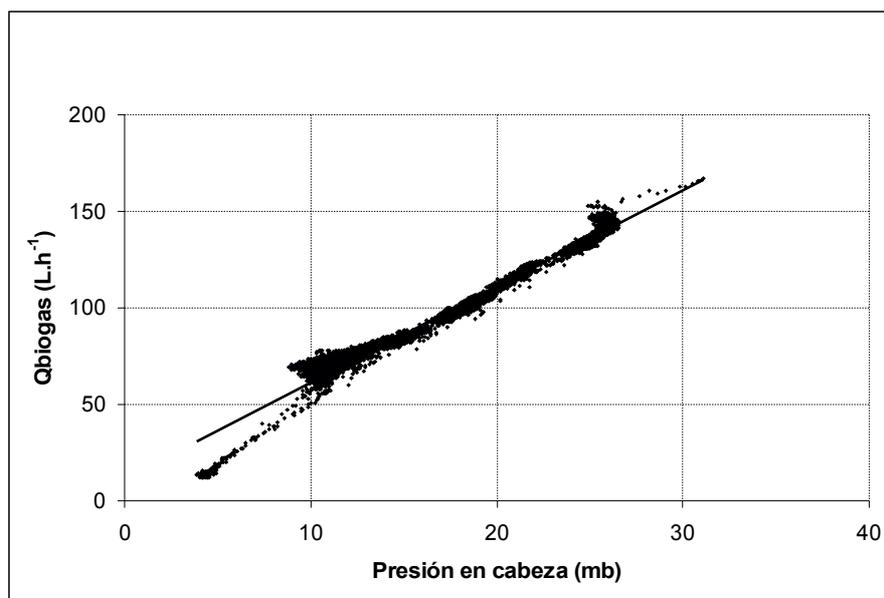


Figura 2.8. Correlación de la presión en cabeza con el caudal de biogás.

$$Q_{\text{biogás}} (\text{L}\cdot\text{h}^{-1}) = 5 \cdot \text{Presión de cabeza (mb)} + 11,05 \quad (\text{con } R^2 = 0,975)$$

2.3.4. Línea de información

La señal generada por los sensores y analizadores se estandariza a una señal de 4 a 20 mA por un transductor instalado en cada equipo. Estas señales para la mayoría de sensores y analizadores se transmiten hasta el panel de indicadores en el pupitre de comando. La Figura 2.9 presenta el diagrama sinóptico de la planta piloto, indicando las líneas de agua, gas e información.

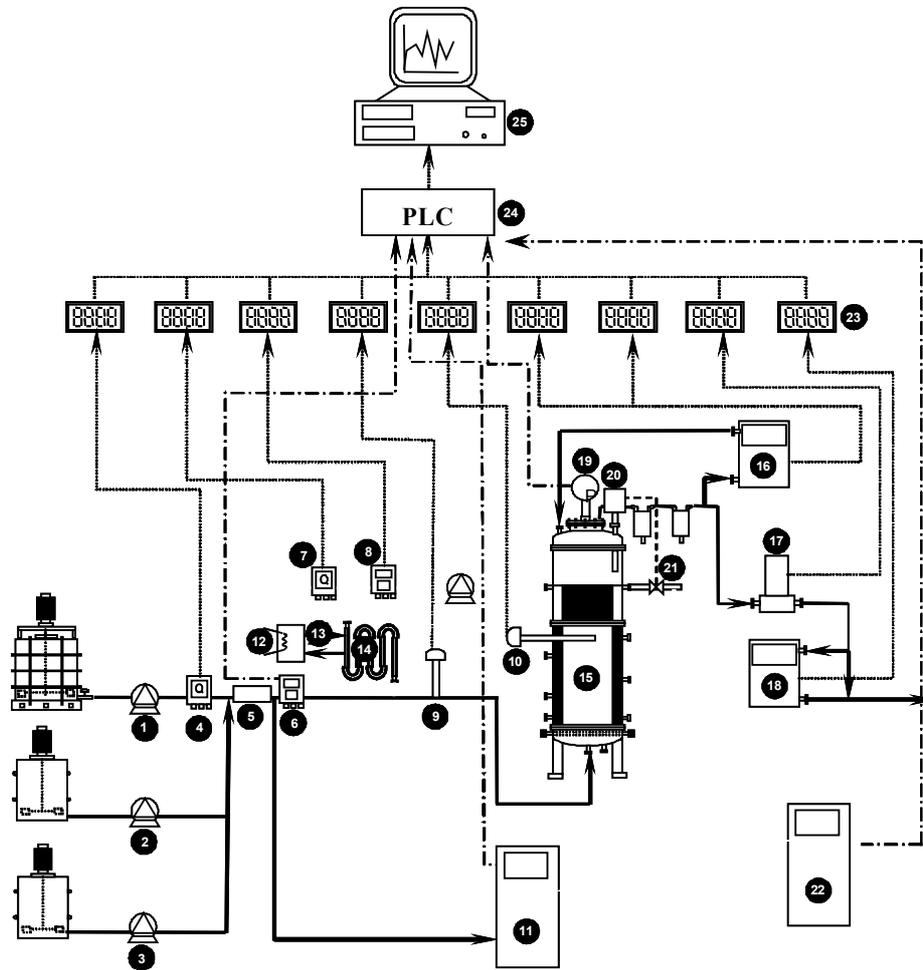


Figura 2.9. Diagrama sinóptico de la planta piloto: 1. Bomba de dilución; 2. Bomba de nutrientes; 3. Bomba de sustrato; 4. Caudalímetro de agua de dilución; 5. Mezclador estático; 6. pH metro de entrada; 7. Caudalímetro de recirculación; 8. pH metro de salida; 9. Sensor de temperatura de entrada; 10. Sensor de temperatura en el reactor; 11. Analizador de TOC *on-line*; 12. Calentador de agua; 13. Bomba de agua caliente; 14. Intercambiador de calor; 15. Reactor híbrido USBF; 16. Analizador de CH₄ y CO; 17. Caudalímetro de biogás; 18. Analizador de H₂; 19. Sensor de presión; 20. Sensor de nivel; 21. Válvula de salida; 22. Analizador de alcalinidad y AGV *on-line* Anasense®; 23. Panel de indicadores; 24. PLC; 25. PC; Líneas de agua y biogás (línea continua). Flujo de información (línea punteada).

Los indicadores (Ditel serie Cosmos modelos Alpha-P y Alpha-T) reciben una señal de 4 a 20 mA y mediante una calibración representan el valor de la variable medida en unidades adecuadas ($L \cdot h^{-1}$, ppm, $mg \cdot L^{-1}$, %). Mediante otra recta de calibrado se transforma el valor mostrado en otra señal de 4 a 20 mA. Todas las señales que salen de los indicadores son alimentadas al PLC (Siemens modelo S-7-200). Otras señales, como las del analizador del TOC, temperatura de entrada del reactor y pH de la alimentación, se envían directamente al PLC.

El PLC transforma las señales analógicas de cada una de las mediciones en señales digitales de 2 bytes (un número de 1 a 32767) que son enviadas al ordenador (Fujitsu-Siemens PIII) para su procesado. El PLC realiza tareas rutinarias como: el envío de señales para el cuadro sinóptico que indican el estado de correcto funcionamiento de todos los equipos y las alarmas cuando las variables medidas sobrepasan ciertos valores previamente definidos, el control *on/off* de la temperatura mediante el arranque o detención de la bomba de agua caliente del intercambiador de calor y el filtrado de la señal del analizador de la concentración de hidrógeno en el biogás.

2.3.5. Software de monitorización

El software de monitorización realiza las actividades de monitorizar, diagnosticar, controlar y supervisar la operación de la planta piloto anaerobia de tratamiento de aguas residuales. A través del PLC, el sistema recoge la información de las variables que definen el estado de la planta piloto. Esta información se almacena en una base de datos MS Acces creada por el operador en el inicio de operación de cada experimento.

Los datos son adquiridos cada 5 segundos y se almacenan en una base de datos temporal. Al completarse 180 datos (15 minutos), los datos son promediados. Para el hidrógeno se guarda al final de los 15 minutos el valor máximo adquirido en este intervalo. Los datos adquiridos cada 5 segundos se pueden observar en una ventana de monitorización *on-line* (Figura 2.10), donde se pueden ver también las consignas de las bombas. La Tabla 2.5 presenta el listado de variables monitorizadas y calculadas a partir de las variables monitorizadas.

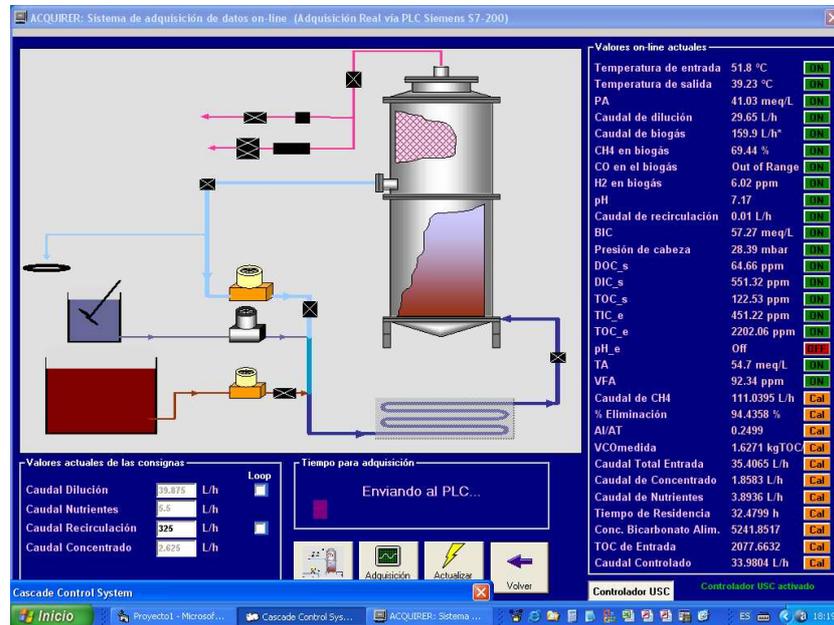


Figura 2.10. Interface de monitorización *on-line* de las variables.

2.3.6. Analizadores *on-line* y equipos auxiliares

Analizador TOC/TIC

La metodología de determinación del carbono orgánico total utilizada *on-line* es idéntica a la presentada en el apartado 2.1 Métodos analíticos, subapartado 2.1.1 Fase líquida. Las mediciones *on-line* se realizaron utilizando un analizador Shimadzu (modelo 4100), que determina el TOC/TIC mediante combustión en horno y determinación del CO₂ por detector NDIR. El analizador posee tres líneas de muestreo secuenciales: TOC/TIC de la alimentación después del mezclador estático, TOC/TIC del efluente recogido desde el depósito de efluente de 2 L descrito previamente y DOC/DIC del efluente, obtenido mediante microfiltración del efluente.

Analizador de CH₄ y CO₂

El analizador de metano y monóxido de carbono utilizado es un Siemens modelo Ultramat 22P, es un equipo de medida basado en el principio de la absorción no dispersiva infrarroja. Consta de fuente emisora de radiación infrarroja, celda de análisis y detector. La fuente emite radiación infrarroja que es absorbida por la muestra en forma proporcional a la concentración del gas en cuestión. El analizador cuenta con dos celdas de análisis: una permite la determinación del metano y la otra del monóxido de carbono. El rango de medida para el contenido de metano es de 0 a 100% y para el monóxido de carbono de 0 a 300 ppm.

El equipo realiza la calibración del cero cada 12 horas en forma automática utilizando nitrógeno; de esta manera se corrigen las variaciones por contaminación de la celda de análisis y por envejecimiento del detector. Adicionalmente cada seis meses se realiza la calibración completa con gases patrón dentro de las labores rutinarias de calibración de equipos en la planta piloto.

Tabla 2.5. Variables monitorizadas y calculadas

Variables de monitorizadas			Variables calculadas		
Número	Descripción	Abreviatura	Número	Descripción	Abreviatura
1	Temperatura entrada	Te	1	Caudal CH4	QCH4
2	Temperatura salida	Ts	2	Eficacia eliminación	%E
3	Alcalinidad Parcial salida	AP	3	Relación alcalinidades intermedia/parcial	IA/AT
4	Caudal dilución	Qdil	4	Velocidad carga orgánica	VCO
5	Caudal biogas	Qbiogas	5	Caudal total entrada	QTe
6	Contenido de CH4	% CH4	6	Caudal sustrato	Qsustrato
7	Concentración de CO	CO	7	Caudal nutrientes	Qnutrientes
8	Concentración de H2	H2	8	Tiempo de retención hidráulico	TRH
9	pH salida	pHs	9	Bicarbonato salida calculado	BIC cal
10	Caudal recirculación	Qr	10	TOC entrada calculado	TOCecal
11	Bicarbonato salida	BIC	11	Caudal controlado	Qcontrolado
12	Presión cabeza	Pcabeza			
13	TOC salida filtrado	DOCs			
14	TIC salida filtrado	DICs			
15	TOC salida	TOCs			
16	TIC entrada	TICe			
17	TOC entrada	TOCe			
18	pH entrada	pHe			
19	Alcalinidad Total salida	AT			
20	Ácidos grasos volátiles salida	AGV			

Analizador de H₂

La determinación de la concentración de hidrógeno en la fase gas se realizó utilizando un sensor de hidrógeno Sensotran modelo Sensotox 420. El principio de medida se basa en la oxidación electroquímica del hidrógeno en un electrodo

sensor. La corriente eléctrica generada en la oxidación del hidrógeno es proporcional a la concentración del mismo.

Para prevenir el deterioro de la celda electroquímica del sensor por gas sulfhídrico (H_2S), se hace pasar la corriente de muestreo por un filtro que atrapa el H_2S . El filtro utiliza como relleno un medio comercial denominado Purafil® Chemisorbant Media, suministrado por Purafil Inc. Dicho producto está compuesto por permanganato de potasio adsorbido en alúmina. A medida que se consume el oxidante, el medio filtrante cambia de color morado a blanco, indicando la necesidad de cambiar el relleno.

La celda electroquímica utilizada permite la determinación de un rango de concentración de hidrógeno de 0 a 2000 ppm. La calibración del equipo se realiza cada 3 meses utilizando nitrógeno para fijar el cero y diluciones sucesivas de una mezcla certificada de hidrógeno y dióxido de carbono para calibrar la respuesta a diferentes concentraciones de hidrógeno.

Analizador de Alcalinidad y Ácidos Grasos Volátiles

La medida de la alcalinidad se utiliza como parámetro indicador de la estabilidad del proceso de tratamiento anaerobio. El aumento de la concentración de AGV acompañado de una disminución rápida de la alcalinidad indica típicamente la acumulación de ácidos grasos volátiles y por lo tanto predice la desestabilización del proceso anaerobio.

En el presente trabajo se validó en planta piloto y en ambiente industrial un analizador titrimétrico automático de alcalinidad y AGV, denominado ANASENSE®, desarrollado en el marco del proyecto Europeo TELEMAT. La descripción del ANASENSE® se presenta en el Capítulo 3.

Una vez validado el Anasense®, se integró en la planta piloto una versión comercial mejorada del analizador permitiendo la determinación *on-line* de los AGV y la alcalinidad en los diferentes experimentos de comportamiento dinámico y estacionario del sistema.

Sistema de Microfiltración

El sistema de microfiltración toma el efluente contenido en el depósito de 2 L y mediante una bomba peristáltica Masterflex (modelo 77601) se bombea a través de un módulo de microfiltración tangencial tubular cerámico de tamaño de corte de $0,80 \mu m$ (Atech Innovations GmbH, modelo MF 80n). La salida del filtro se retorna al depósito de efluente. El filtrado se recoge en un recipiente de 100 mL dispuesto en el exterior del tubo cerámico.

Cuando el nivel de filtrado alcanza la capacidad máxima del depósito, un sensor de nivel, compuesto por dos electrodos de platino, detiene la bomba. El filtrado

recogido es succionado directamente por los analizadores que determinan el contenido de TOC y TIC (TOC Shimadzu 4100), la alcalinidad y los AGV (ANASENSE®); adicionalmente se utiliza este filtrado en la toma de muestras *off-line* del efluente. El bombeo y recirculación del efluente contenido en el depósito de efluente tienen un doble efecto, por un lado se utiliza para generar el filtrado y, por otro, homogeneiza el efluente contenido en el depósito generando una muestra más representativa.

Muestreador automático de fracciones

Se utilizó un muestreador de fracciones Biorad (modelo 2110) en la toma continua de muestras para el análisis *off-line* de: AGV, las formas de nitrógeno (NT, NI y NTK) y los trazadores utilizados en la determinación de la distribución de tiempos de residencia en el reactor (DTR). El muestreador de fracciones combinado con una bomba peristáltica, permite la toma de muestras a intervalos regulares de tiempo (generalmente se utilizó un tiempo de muestreo de 60 minutos).

2.4. Referencias

- Ahring B.K., Sandberg M. and Angelidaki I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(3), 559-565.
- Angelidaki I. and Sanders W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3 (2), 117-129.
- Beun J.J., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J.(2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research*, 36 (3), 702-712.
- Elias A., Barona A., Ormazabal J., Ibarra G. and Caamano J. (1999). Anaerobic treatment of acidified and non-acidified substrata in UASB reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(10), 949-956.
- Fernandez J.M. (1994). Tratamiento de aguas residuales de las industrias de tablero de fibra. Tesis Doctoral, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos, Universidad Santiago de Compostela, España.
- Fernandez J.M., Mendez R. and Lema J.M. (2001). Anaerobic treatment of fibreboard manufacturing wastewaters in a pilot scale hybrid USBF reactor. *Water Research*, 35 (17), 4150-4158.
- Franco A. (2004). Biorreactores pulsantes para el tratamiento anaerobio/anóxico de aguas residuales de alta carga. Tesis Doctoral, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Ghose T.K. (1987). Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59 (2), 257-268.
- Guiot S.R. (1991). Modelling the upflow anaerobic sludge bed-filter system: a case with hysteresis. *Water Research*, 25 (3), 251-262.
- Jawed M. and Tare V. (1999). Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA*, 25 (3), 345-350.
- Jeison D. and Chamy R. (1998). Novel technique for measuring the size distribution of granules from anaerobic reactors for wastewater treatment. *Biotechnology Techniques*, 12 (9), 659-662.
- Jenkins S.R., Morgan J.M. and Sawyer C.L. (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Journal WPCF*, 55 (5), 448-453.
- Lema J.M., Mendez R. y Soto M. (1992). Bases cinéticas y microbiológicas en el diseño de digestores anaerobios. *Ingeniería Química*, enero, 191-201.
- Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. (1992). APHA-AWWA-WPCF. Ed. Diaz Santos S.A., Madrid, España.
- Miller L.G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 61(3), 426-428.
- Ripley L.E., Boyle W.C. and Converse J.C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, 58 (5), 406-411.

- Ruiz G. (2005). Monitorización y control avanzado de reactores anaerobios. Tesis Doctoral, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Speece R.E. (1996). Anaerobic Biotechnology for industrial wastewaters. Archae Press, Nashville, USA.
- Soto M., Veiga M.C., Mendez R. and Lema J.M. (1989). Semi-micro C.O.D. determination method for high-salinity wastewater. *Environmental Technology Letters*, 10, 541-548.
- Soto M., Mendez R. y Lema J.M. (1993a). Operación y control de digestores anaerobios (I). *Ingeniería Química*, septiembre, 467-474.
- Soto M., Méndez R. and Lema J.M. (1993b). Methanogenic and non-methanogenic activity test. Theoretical basis and experimental set up. *Water Research*, 27 (8), 1361-1376.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater. (1985), 16th Edition. APHA-AWWA-WPCF, Washington.
- Switzenbaum M.S., Giraldo-Gómez E. and Hickey R.F. (1990). Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. *Enzyme and Microbial Technology*, 12 (10), 722-730.
- Syutsubo K., Sinthurat N., Ohashi A. and Harada H. (2001). Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change. *Water Science and Technology*, 43 (1), 59-66.
- Wentzel M.C., Moosbrugger R.E., Sam-Soon P.A.L.N.S., Ekama G.A. and Marais G.v.R. (1994). Tentative guidelines for waste selection, process design, operation and control of upflow anaerobic sludge bed reactors. *Water Science and Technology*, 30 (12), 31-42.
- Zegers F. (1987). Microbiología, arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo – UASB. En: Manual de curso. Universidad del Valle, Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca y Universidad Agrícola de Wageningen. Cali. Colombia. Pp A-1 – A-14.

Capítulo 3

Validación de un sistema automático de monitorización de alcalinidad y ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios

Resumen

En este capítulo se realizó el estudio y validación de metodologías de valoración *on-line* de la alcalinidad y ácidos grasos volátiles en reactores anaerobios, incluyendo la prueba y validación de un prototipo de analizador automático operando con tres metodologías diferentes; desarrolladas por INRA (Francia, Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas), AppliTek (Bélgica, empresa de desarrollo y comercialización de sensores *on-line*) y Biomath (Bélgica, grupo de investigación de la Universidad de Ghent).

Los estudios se realizaron utilizando el analizador denominado ANASENSE®, equipo desarrollado en el marco del proyecto Europeo TELEMAT (TELEMonitoring and Advance telecontrol of high yield wastewater treatment). La validación tanto del analizador como de las metodologías de análisis se llevó a cabo en la planta piloto del Departamento de Ingeniería Química de la USC, utilizando para ello el reactor híbrido USBF descrito en el capítulo 2. Posteriormente se realizó la validación del equipo en la depuradora de aguas residuales industriales de la cervecera Estrella de Galicia Hijos de Rivera S.A.

Respecto a las metodologías estudiadas, las de INRA y Applitek presentaron en general buena precisión y exactitud para la determinación de AGV (0 a 4900 mg·L⁻¹) y bicarbonato (0 a 50 mg·L⁻¹). Por otro lado, las metodologías Biomath permiten la determinación, aunque con un margen de error considerable, de otros compuestos como amonio y ácido láctico, generando resultados cualitativos que permiten estimar tendencias.

La validación del equipo en ambiente industrial permitió detectar algunas debilidades en su funcionamiento, relacionadas con su robustez. Los principales fallos están relacionados con la presencia de sólidos en el efluente y los consiguientes errores en la toma y análisis de la muestra.

Posterior a la validación del ANASENSE® y de las tres metodologías de valoración *on-line* de la alcalinidad y ácidos grasos volátiles; se integró a la planta piloto anaerobia (descrita en el capítulo 2) una versión comercial del sensor utilizando la metodología INRA con la finalidad de realizar los estudios de selección de variables para la identificación de perturbaciones en digestores anaerobios (temática desarrollada en el capítulo 4).

Índice

3.1. Introducción

- 3.1.1. Importancia de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles en la operación de reactores anaerobios
- 3.1.2. Curva de valoración y capacidad tampón
- 3.1.3. Estado del arte de la determinación *on-line* de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles

3.2. Materiales y métodos

- 3.2.1. Descripción del analizador ANASENSE®
- 3.2.2. Metodologías utilizadas en la determinación de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles
- 3.2.3. Unidades experimentales
- 3.2.4. Protocolos de validación
- 3.2.5. Métodos de valoración y análisis
- 3.2.6. Regresión lineal simple

3.3. Resultados y discusión

- 3.3.1. Validación en planta piloto
- 3.3.2. Validación en planta industrial

3.4. Conclusiones y recomendaciones

- 3.4.1. Conclusiones
- 3.4.2. Recomendaciones

3.5. Referencias

3.1. Introducción

3.1.1. Importancia de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles en la operación de reactores anaerobios

El proceso de tratamiento anaerobio se caracteriza por la mineralización de la materia orgánica en productos como hidrógeno, metano, dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno (Vanrolleghem and Lee, 2003). La operación exitosa de los sistemas anaerobios depende en gran medida de que el rango de pH se mantenga entre 6,6 y 7,4 (Moosbrugger *et al.*, 1992; Lahav *et al.*, 2002a). La regulación del pH en los reactores anaerobios la ejerce fundamentalmente el bicarbonato (alcalinidad bicarbonática) que generalmente se mantiene en niveles de 10 a 50 mM (Hawkes *et al.*, 1994).

Se acepta que los reactores anaerobios se acidifican debido a sobrecargas y presencia de tóxicos. Dicha acidificación se debe a la diferencia de velocidades con que las poblaciones bacterianas realizan la acidogénesis y la metanogénesis, con lo cual se acumulan AGV que afectan el pH, y se produce la acidificación del reactor. De hecho, la medida del pH no permite adelantarse a la acidificación del sistema, pues su disminución es la respuesta al agotamiento de la alcalinidad; por ello se considera que los AGV son el intermediario más importante en el proceso de digestión anaerobia (Vanrolleghem and Lee, 2003).

El pH es el factor clave en el equilibrio de disociación de algunos productos intermedios del proceso, especialmente de los ácidos grasos volátiles. Cada grupo trófico implicado en la digestión anaerobia tiene un valor óptimo de pH: 7,2 a 7,4 para las bacterias hidrolíticas, 6,0 a 6,2 para las bacterias acidogénicas y 6,5 a 7,5 para las bacterias metanogénicas. Cuando el pH desciende a valores por debajo de 6,5, la actividad metanogénica disminuye, deteniéndose totalmente a pH 5,5 (Ruiz, 2005a).

Generalmente se considera que la alcalinidad bicarbonática, la concentración de AGV y la presión parcial del hidrógeno en el biogás, son los mejores parámetros para monitorizar el proceso de digestión anaerobia (Switzenbaum *et al.*, 1990; Rozzi *et al.*, 1997). Algunos investigadores identifican el cambio en la concentración de AGV en el efluente como un factor que afecta, muy sensiblemente la dinámica de los digestores anaerobios (Lahav y Loewenthal, 2000) y por lo tanto la concentración de AGV es un buen parámetro para identificar perturbaciones en el proceso. La dificultad estriba en que los métodos tradicionales de medida de los AGV por cromatografía de gases son costosos y requieren equipos medianamente sofisticados.

Otro enfoque consiste en utilizar en la monitorización de digestores anaerobios la alcalinidad (McCarty, 1964) y las relaciones entre los diferentes tipos de alcalinidad definidos en el apartado 2.1.1. Estas relaciones son: alcalinidad intermedia/alcalinidad total (AI/AT) y alcalinidad intermedia/alcalinidad parcial (AI/AP) (Ripley *et al.*, 1986; Anderson and Yang., 1992; Puñal *et al.*, 2001).

Ripley *et al.* (1986) evaluaron la relación AI/AP en digestores anaerobios piloto tratando estiércol, encontrando que una relación AI/AP de 0,3 garantiza el funcionamiento adecuado del proceso. Una alternativa en la diagnosis y control de reactores anaerobios utilizando lógica fuzzy consiste en usar la relación AI/AP ó la relación AI/AT como criterio límite de la estabilidad del proceso (García *et al.*, 2007). Otros investigadores (Puñal *et al.*, 2001; Steyer *et al.*, 2006) incluyen el criterio de contar con una adecuada cantidad de alcalinidad total y, por tanto, una operación segura del proceso requiere valores de $AI/AT \leq 0,3$ y $AT \geq 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Contar con metodologías *on-line* robustas de determinación de AGV y alcalinidad, con costes de implementación y operación razonables; es fundamental tanto en el estudio del comportamiento dinámico como en el control de los reactores anaerobios. Por esta razón se desarrolla en este trabajo la validación de un sistema automático de monitorización de alcalinidad y ácidos grasos volátiles. Una vez validadas las metodologías y el analizador ANASENSE®; se integró una versión comercial del sensor a la planta piloto con el fin de complementar la monitorización *on-line* existente.

3.1.2. Curva de valoración y capacidad tampón

Curva de valoración

La curva de valoración se obtiene adicionando pequeñas cantidades de base o ácido fuerte de concentraciones conocidas a la solución problema, registrando simultáneamente la variación del pH tras cada adición. El gráfico de la variación del pH frente al volumen adicionado de ácido o base, se denomina curva de valoración, que presenta generalmente un comportamiento de curva en S, lo que indica que el pH no cambia a una tasa constante frente a la adición de ácido o base y que, por tanto, existen puntos de inflexión. La Figura 3.1 muestra un ejemplo típico de una curva de valoración cuando existe presencia de bicarbonato y ácido acético en la solución.

Los puntos de inflexión de la curva de valoración están relacionados con la cercanía a los valores del pK_a de los compuestos presentes en la solución; en otras palabras los valores del pH a los cuales se presenta mayor resistencia a la disminución del pH indican los valores aproximados de los pK_a de las sustancias presentes (Van Vooren *et al.*, 1996).

El pK_a se calcula como el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un compuesto de acuerdo con la Ecuación 3.1.

$$pK_a = -\log[K_a] \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Como ya se mencionó, para condiciones normales de operación de la digestión anaerobia, en el rango de pH de 6,7 a 7,4, los principales compuestos que aportan capacidad tampón son el bicarbonato y los ácidos grasos volátiles; sin embargo al ampliar el rango de pH de 3,0 a 8,5, otros compuestos pueden aportar también capacidad tampón.

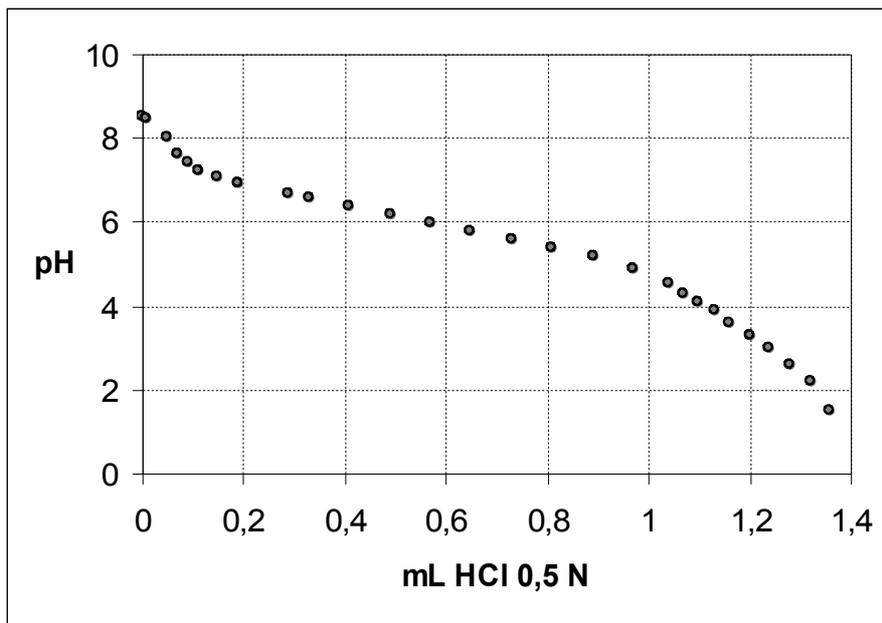


Figura 3.1. Curva de valoración de una solución que contiene bicarbonato y ácido acético.

En la Tabla 3.1 se presentan los valores de pK_a para los compuestos que pueden aportar capacidad tampón en el rango de pH 3,0 a 8,5. En la práctica, debido a que los ácidos grasos volátiles presentes en efluentes de digestores poseen valores de pK_a muy similares, se agrupan todos como ácido acético.

Tabla 3.1. Valores de pK_a , para los principales compuestos presentes en efluentes de digestores anaerobios.

Componente	pK_a
Ácido acético	4,75
Ácido propiónico	4,87
Ácido n-butírico	4,81
Ácido iso-butírico	4,84
Ácido n-valérico	4,82
Ácido iso-valérico	4,77
$H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$	6,37
$HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{2-} + H^+$	10,25
$H_3PO_4 \leftrightarrow H_2PO_4^- + H^+$	2,12
$H_2PO_4^- \leftrightarrow HPO_4^{2-} + H^+$	7,21
$HPO_4^{2-} \leftrightarrow PO_4^{3-} + H^+$	12,67
$NH_4^+ \leftrightarrow NH_3 + H^+$	9,25
$H_2S \leftrightarrow HS^- + H^+$	7,02

Capacidad tampón

La capacidad Tampón (β) se define como el número de moles de ácido fuerte o base fuerte que deben añadirse a una solución de 1 litro, para disminuir o aumentar el pH en una unidad. El perfil de capacidad tampón se construye a partir de la curva de valoración; calculando para cada punto de pH la derivada de la cantidad de ácido o base añadida frente a la variación del pH ($meq \cdot L^{-1} \cdot pH^{-1}$). La Figura 3.2 presenta el perfil típico de capacidad tampón de una solución que contiene bicarbonato y ácido acético. Los puntos de inflexión de la curva de valoración corresponden a valores máximos en el perfil de la capacidad tampón aportada por cada uno de los compuestos presentes.

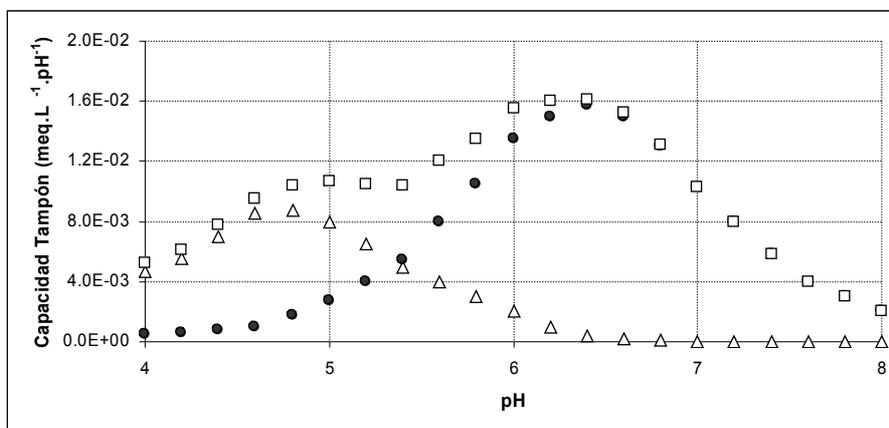


Figura 3.2. Curva de capacidad tampón cuando solo se presentan ácidos grasos volátiles y bicarbonato. AGV (Δ), bicarbonato (□), AGV+bicarbonato (●).

3.1.3. Estado del arte de la determinación *on-line* de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles

La alcalinidad bicarbonática y los AGV se determinan empleando técnicas que responden a cuatro enfoques básicos, que se comentan a continuación.

El primer enfoque consiste en utilizar técnicas de valoración con un ácido o una base fuerte. Existen propuestas de realizar la valoración a varios puntos de pH, que van desde valoraciones simples a 2 y 3 puntos de pH (Jenkins *et al.*, 1983; Anderson y Yang, 1992; Hawkes *et al.*, 1994) y valoraciones más complejas a 4, 5 y 8 puntos de pH (Moosbrugger *et al.*, 1992; Buchauer, 1998; Lahav y Loewenthal, 2000; Feitkenhauer *et al.*, 2001; Bouvier *et al.*, 2002; Lahav *et al.*, 2002a).

Sin embargo, cuando solo se toman algunos puntos de la curva de valoración y la muestra presenta concentraciones importantes de amonio y fosfatos, se observan interferencias con estos compuestos que se comportan como ácidos o bases débiles aportando alcalinidad a la muestra. Para resolver este problema se han planteado varias propuestas, una de ellas consiste en la combinación de la valoración del sistema ácido/base débil, con determinaciones por métodos estándar de los otros compuestos que pueden aportar capacidad tampón como: amonio, fosfatos y sulfuros (Moosbrugger *et al.*, 1992). Otra propuesta se fundamenta en una valoración completa y detallada entre pH 3 y 11, construyendo el perfil de la capacidad tampón y modelando matemáticamente su comportamiento con el fin de identificar las diferentes especies que aportan alcalinidad en la muestra estudiada (Van Vooren *et al.*, 1996; Van Vooren, 2000; Van Vooren *et al.*, 2001; Van de Steene *et al.*, 2002; Zaher y Vanrolleghem, 2005).

El segundo enfoque utiliza la medición de AGV y alcalinidad por otros métodos de análisis diferentes a la valoración, como: cromatografía de gases, espectrofotometría y espectrometría infrarroja de transformada de Fourier o por combinaciones de estas metodologías con medidas realizadas por valoración (Björnsson *et al.*, 2001; Pind *et al.*, 2002; Steyer *et al.*, 2002a, 2002b; Vanrolleghem and Lee, 2003; Spanjers *et al.*, 2006). La determinación de AGV mediante cromatografía de gases requiere la filtración o centrifugación de la muestra, lo cual dificulta su implementación on line; una solución novedosa para esta problemática es la utilización de cromatografía de espacio de cabeza transfiriendo los AGV de la fase líquida a la fase gaseosa por acidificación con H_3PO_4 y $NaHSO_4$ (Kanokwan *et al.*, 2007).

El tercer enfoque permite la determinación de la alcalinidad bicarbonática a través de la cuantificación del dióxido de carbono generado cuando la muestra es acidificada. Lo cual se puede hacer de dos maneras: determinando la sobrepresión en un recipiente de volumen constante o midiendo el volumen de gas producido con un gasómetro de alta sensibilidad (Hawkes *et al.*, 1994); en este caso no se determina la concentración de AGV.

El cuarto enfoque consiste en la utilización de biosensores para la determinación indirecta de los AGV. Un ejemplo de esto es la propuesta de Rozzi *et al.* (1997) de utilizar la desnitrificación en presencia de exceso de nitrato, como una medida indirecta de la concentración de AGV (DQO) presente en el efluente de un digestor anaerobio. Por medio de este enfoque no se determina la alcalinidad.

En resumen, los dos primeros enfoques permiten la determinación tanto de la alcalinidad como de los AGV, el tercer enfoque solo evalúa la alcalinidad bicarbonática y el cuarto aporta una estimación indirecta de los AGV

La Tabla 3.2, adaptada de Lahav and Morgan (2004), presenta una revisión de algunos métodos que utilizan la valoración como principio de determinación, solo cuatro de los métodos referenciados han sido utilizados para monitorización *on-line* y de ellos solo tres permiten la determinación simultánea de AGV y Alcalinidad bicarbonática.

Los métodos de análisis de alcalinidad y AGV que se estudian en este capítulo se centra en el primer enfoque; debido a que las técnicas de valoración agregando cantidades conocidas de ácido o base son las que presentan mejores características técnicas y económicas para ser automatizadas (Vanrolleghem and Lee, 2003; Zaher and Vanrolleghem, 2005).

Tabla 3.2. Comparación de metodologías para la determinación de AGV y Alcalinidad bicarbonática por valoración.

Referencia	Parámetros medidos	Descripción	Aplicabilidad
McGhee (1968)	AGV	Valoración entre pH 5,0 y 4,0	Suministra el cambio en las concentraciones de AGV. Se puede utilizar conjuntamente con otro método más exacto
Jenkins <i>et al.</i> (1983)	AGV y Alcalinidad bicarbonática	Valoración a 2 puntos de pH (5,75 y 4,3)	Suministra buena información sobre la tendencia, especialmente cuando la relación alcalinidad bicarbonática a AGV en concentración presenta valores bajos 10 a 1
Anderson y Yang (1992) ; Feitkenhauer <i>et al.</i> (2001)	AGV y Alcalinidad bicarbonática	Valoración a 2 puntos de pH (5,1 y 3,5), se tiene en cuenta el pH inicial	Presenta buenos resultados en aplicaciones prácticas en depuradoras, no contempla las interferencias con los aportes de alcalinidad por presencia de amonio y fosfato, utilizado en monitorización <i>on-line</i>
Moosbrugger <i>et al.</i> (1992)	AGV y Alcalinidad bicarbonática	Valoración a 5 puntos de pH	Presenta buenos resultados. El amonio, fosfato y sulfuro deben determinarse por otros métodos para tener en cuenta su interferencia
Kapp (1992); Bouvier <i>et al.</i> (2002)	AGV y Alcalinidad bicarbonática	Valoración entre pH 4,0 y 5,0	Presenta buenos resultados. No cuantifica los aportes de alcalinidad por presencia de amonio y fosfato, utilizado en monitorización <i>on-line</i>
Hawkes <i>et al.</i> (1994)	Alcalinidad bicarbonática	Valoración a pH 4 y medición del CO ₂ desprendido	Resultados adecuados. No determina AGV, utilizado en monitorización <i>on-line</i>
Van Vooren <i>et al.</i> (1996, 2001); Van de Steene <i>et al.</i> (2002); Zaher y Vanrolleghem, 2005	AGV, Alcalinidad bicarbonática, Amonio, Fosfatos y otros Ácidos Grasos	Valoración completa y detallada de pH 11 a pH 3, construcción del perfil de capacidad tampón	Buenos resultados, permite estimar las concentraciones de amonio, fosfato y otros ácidos grasos como el ácido láctico, utilizado en monitorización <i>on-line</i>
Lahav y Loewenthal (2000); Lahav <i>et al.</i> (2002b)	AGV y Alcalinidad bicarbonática	Valoración a 8 puntos de pH	Presenta buenos resultados, el amonio, fosfato y sulfuro deben determinarse por otros métodos para tener en cuenta su interferencia

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Descripción del analizador ANASENSE®

El prototipo del analizador utilizado (AppliTek, 2003; De Neve y Lievens, 2004), fue desarrollado en el marco del proyecto Europeo TELEMAT (Bernard *et al.*, 2005) y esta compuesto fundamentalmente por un sistema de valoración automático acoplado con un software que estima, utilizando diferentes metodologías (INRA, AppliTek y Biomath), las concentraciones de AGV, bicarbonato y la alcalinidad parcial y total.

El analizador consta de dos compartimentos. El superior, de procesamiento de datos, alberga un PC embebido, con pantalla táctil y sistema de almacenamiento de la información. El compartimento inferior, área de análisis, incluye las bombas de muestreo y drenaje, microbureta y sensor de pH. En la parte posterior del equipo se ubican los interruptores eléctricos y los controladores electrónicos. En la Figura 3.3 a se presenta una fotografía del prototipo utilizado y en la Figura 3.3 b se muestra la secuencia de acciones que realiza el analizador en cada determinación.

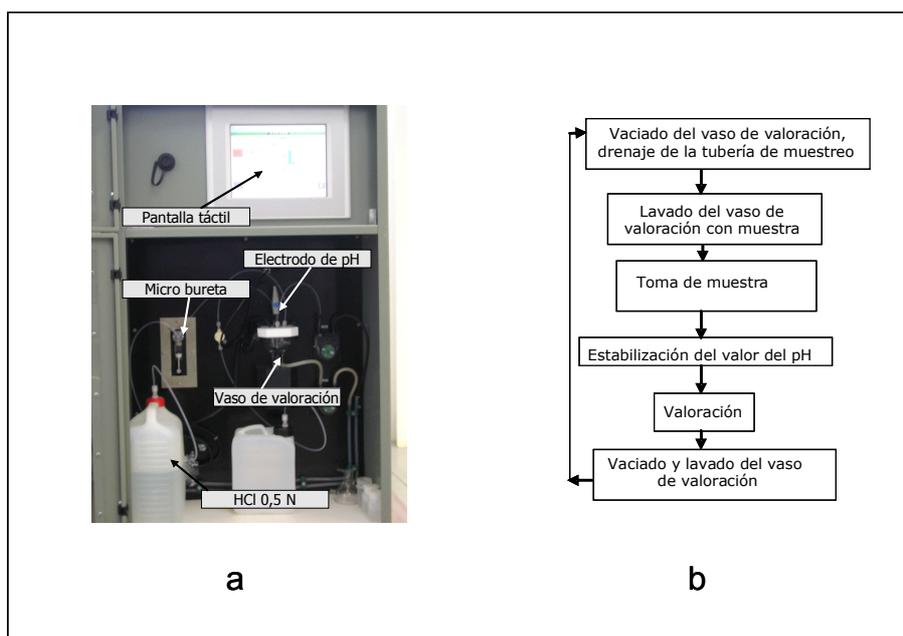


Figura 3.3. Fotografía del prototipo de ANASENSE® utilizado (a) y secuencia de acciones realizadas en una determinación (b).

A continuación se presenta una descripción resumida de los componentes del equipo:

- PC con pantalla táctil y sistema de almacenamiento de la información. Normalmente el manejo del equipo se realiza a través de la pantalla táctil; solo se utiliza teclado para intervenciones que signifiquen cambios del software.
- Bomba de muestreo. Bomba peristáltica que se utiliza para purgar el tubo de toma de muestra y tomar muestra fresca.
- Bomba de drenaje. Bomba de membrana, se encarga de drenar el vaso de valoración después de cada valoración o del lavado.
- Bomba de aire. Suministra aire comprimido, que se requiere para airear la muestra cuando se utiliza el método Applitek.
- Micro bomba para corrección de pH. Dispensa aproximadamente 50 μL en cada dosis, se utiliza para incrementar el pH cuando el método de medición lo requiere. La exactitud en la dosificación de esta bomba no es crítica para los resultados finales de los parámetros medidos.
- Bureta. Bureta de precisión, dotada de un motor de pasos para dosificación exacta, la exactitud es fundamental para medir adecuadamente los diferentes parámetros, el paso menor de dosificación de la bureta es 1 μL .
- Válvula de 3 vías. Una de las vías se utiliza para la línea de entrada de la muestra, otra para el agua de lavado y la última se conecta al recipiente de almacenamiento de la solución de valoración para llenado de la bureta.
- Vaso de valoración. El vaso de valoración, fabricado en vidrio, se apoya en un agitador magnético, permite la homogenización de la muestra antes y durante la valoración.
- Sensor de pH. Electrodo de pH en vidrio.

El analizador tiene como principio de funcionamiento la valoración con ácido o base de concentración conocida. La muestra de efluente del digestor anaerobio es homogenizada por agitación en el vaso de valoración, posteriormente se lleva a cabo la valoración en modo automático, añadiendo en forma paulatina pequeñas cantidades de HCl y registrando la variación del pH. A partir de la curva de valoración se estiman cuatro parámetros: AGV equivalentes en ácido acético, bicarbonato, alcalinidad parcial (PA) y alcalinidad total (TA).

3.2.2 Metodologías utilizadas en la determinación *on-line* de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles

Metodología INRA

El método INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, Narbonne, Francia) esta basado en el método propuesto por Kapp (1992) para la medición de AGV, extendido para valorar también el bicarbonato (Bouvier *et al.*, 2002). A su vez

Kapp (1992) fundamentó su método en el procedimiento propuesto por McGhee (1968).

De acuerdo con McGhee (1968), la cantidad de ácido requerido para valorar una muestra de pH 5,0 a pH 4,0 es proporcional a la concentración presente de AGV, debido a que en ese intervalo de pH usualmente no existe un subsistema ácido/base débil diferente de los AGV. Al tener los ácidos (acético, propiónico y butírico) valores de pKa muy similares (pKa acético 4,75), los tres ácidos presentan una capacidad tampón similar y se pueden cuantificar como ácido acético.

Las otras sustancias tampón consideradas en el cálculo propuesto por Kapp (1992) se corresponden con el subsistema del carbonato de $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ que tiene un pKa de aproximadamente 6,3. El aporte de otros sistemas tampón como: $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, $\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}$ y $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$; se considera despreciable, debido a que sus valores de pKa son altos, respectivamente 7,20; 7,02 y 9,25.

El método propuesto por Kapp (1992) es relativamente fácil de implementar para determinar los AGV en concentraciones entre 0 y 3500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Bouvier *et al.*, 2002) debido a que sólo se requiere conocer la alcalinidad total a pH 4,3 (donde menos del 1 % del bicarbonato se convierte a dióxido de carbono) y el volumen adicionado para bajar el pH de 5 a 4 (VA_{5-4}).

Aplicando el método Kapp (1992) al realizar en forma iterativa el ajuste de datos experimentales se llega a la Ecuación 3.2 (Buchauer, 1998).

$$AGV = (131340 \cdot N \cdot VA_{5-4}) / V_m - (3,08 \cdot ALK_{4,3}) - 10,9 \quad (\text{Ec. 3.2})$$

Donde:

AGV :	Concentración de AGV ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
N :	Normalidad de la solución de valoración ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$)
VA_{5-4} :	Volumen de ácido (mL) dosificado entre pH 5 y 4
V_m :	Volumen de muestra (mL)
$ALK_{4,3}$:	Alcalinidad Total ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$)

La suposición que conduce al ajuste de la ecuación anterior es que el único AGV presente es ácido acético y sólo el 60 % del mismo está en forma no ionizada (CH_3COOH) a pH 4,3. Por tanto, la alcalinidad aportada por el acetato (ALK_{AGV}) se puede evaluar a través de la Ecuación 3.3.

$$ALK_{AGV} = 0,6 \cdot AGV / 60 = 0,01 \cdot AGV \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Metodología Applitek

El método AppliTek (Bélgica), empresa que trabaja en innovación, desarrollo y comercialización de sensores *on-line*, consiste en una modificación del método de McGhee (1968). Tal como se presentó en el apartado anterior, el método McGhee (1968) no contempla la influencia de los sistemas buffer diferentes a los AGV. Todos los sistemas adicionales (por ejemplo: $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, $\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}$ y $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) en conjunto con el pH inicial y el desprendimiento de CO_2 , influyen en la medición de los AGV. Por esta razón, el método Kapp (1992) no es adecuado para concentraciones de AGV bajas ($0\text{-}250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Con el fin de disponer de un método adecuado y de fácil aplicación sin requerir de la determinación de los otros sistemas buffer que interfieren la medida de los AGV, AppliTek desarrolló una nueva metodología durante el proyecto TELEMAT (TELEMAT, 2003).

Esta metodología, también basada en el método McGhee (1968), consiste en airear la muestra a un pH mayor que 5, con lo cual tanto el bicarbonato (en forma de CO_2) como el sulfuro de hidrógeno son desalojados del líquido, sin una disminución apreciable de los AGV. Tras la aireación, los AGV se valoran directamente de pH 5 a 4.

Debido a que los sistemas buffer como $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ y $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, influyen a pH mucho mayor de 5 y que las interferencias del bicarbonato y sulfuro de hidrógeno se eliminan por aireación de la muestra, solo el sistema buffer $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}_3\text{PO}_4$ con pKa de 2,12 puede interferir eventualmente en la determinación de los AGV por esta metodología.

Metodología Biomath

El método BIOMATH, desarrollado por este grupo de la Universidad de Ghent (Bélgica), se fundamenta en la utilización de un modelo matemático que estima la concentración de AGV y alcalinidad a partir de la curva de capacidad tampón construida a partir de la curva de valoración de la muestra (Van Vooren, 2000). Se utiliza un vaso de valoración cerrado para evitar la pérdida de CO_2 con el fin de medir cuidadosamente la alcalinidad.

La curva de valoración se construye a partir de valores sucesivos del pH tras pequeñas adiciones de ácido o base. Así, la curva de valoración puede contener típicamente de 30 a 50 puntos. Un sistema de valoración automático realiza esta función; capturando todos los datos mediante un PC.

La capacidad tampón para cada punto de pH se calcula como la derivada de la cantidad de ácido o base añadida ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{pH}^{-1}$). El perfil de capacidad tampón es el

resultado de la suma de las capacidades tampón de cada componente individual de la solución como se muestra en la ecuación 3.4 (Van Vooren *et al.*, 2001).

$$\beta = 2,303[H^+] \cdot \left(1 + \sum_{i=1}^l C_i \cdot \left(\frac{K_a}{[H^+] + K_a} \right)^2 \right) + \sum_{j=1}^m C_j \cdot \left(\frac{K_{a1} \cdot \left([H^+]^2 + 4 \cdot K_{a2} \cdot [H^+] + K_{a1} \cdot K_{a2} \right)}{\left([H^+]^2 + K_{a1} \cdot [H^+] + K_{a1} \cdot K_{a2} \right)^2} \right) + \sum_{k=1}^n C_k \cdot \left(\frac{K_{a1} \cdot \left([H^+]^4 + 4 \cdot K_{a2} \cdot [H^+]^3 + (K_{a1} + 9K_{a3}) \cdot K_{a2} \cdot [H^+]^2 + (4 \cdot [H^+] + K_{a2}) \cdot K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3} \right)}{\left([H^+]^3 + K_{a1} \cdot [H^+]^2 + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot [H^+] + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3} \right)^2} \right) \quad (\text{Ec. 3.4})$$

Donde:

β : capacidad tampón (eq·L⁻¹·pH⁻¹)

[H⁺]: concentración de iones hidrógeno (mol·L⁻¹), igual a 10^{-pH}

C_{i, j, k}: concentración ácidos débiles monopróticos, dipróticos o tripróticos (mol·L⁻¹)

K_a: constante de ionización ácida

En el método BIOMATH se realiza la estimación de las concentraciones de AGV y de bicarbonato por separado; partiendo de un perfil de capacidad tampón total, como el presentado en la figura 3.2. De la misma manera, se pueden estimar los aportes de otros subsistemas tampón presentes en los efluentes de digestores anaerobios, como el amonio o los fosfatos. Los métodos utilizados para seleccionar el modelo y estimar los patrones se presentan en Van de Steene *et al.* (2002).

El modelo denominado "Modelo de Construcción Automática de Capacidad Tampón" (Automatic Buffer Capacity Model Building); realiza una estimación inicial del perfil de la capacidad buffer incluyendo solo bicarbonato y AGV; posteriormente calcula los valores residuales entre los datos experimentales y los datos estimados; y toma la decisión de incluir nuevas sustancias (extender el modelo) si los valores residuales superan un margen fijado de antemano (Zaher and Vanrolleghem, 2005)

El modelo extendido selecciona nuevas sustancias (amonio, fosfatos y otros ácidos orgánicos) a incluir potencialmente, en base a la identificación de los pH a los cuales ocurren máximos y mínimos en la capacidad tampón medida, seleccionando las sustancias que presentan valores de pK_a más cercanos a estos puntos de inflexión. Estima nuevamente la curva de capacidad tampón incluyendo las sustancias seleccionadas y compara el estimado con los datos experimentales. El modelo busca la solución óptima; minimizando las diferencias entre lo estimado y lo medido para lo cual efectúa las iteraciones necesarias para cumplir con las condiciones definidas de antemano.

En este trabajo la metodología BIOMATH se aplicó con dos variantes, Biomath1 corresponde al método utilizado sin realizar ajuste inicial de pH, mientras que Biomath2 hace referencia al método haciendo ajuste inicial a pH 11 con la finalidad de realizar la valoración completa desde pH 11 hasta pH 3, barriendo así un espectro amplio de sustancias que pueden aportar alcalinidad.

3.2.3 Montajes experimentales para la validación del ANASENSE®

La validación del analizador ANASENSE® se realizó a escala piloto e industrial, la validación a escala piloto se desarrolló en la planta piloto anaerobia descrita en el capítulo 2, apartado 2.3; utilizando un agua residual sintética compuesta fundamentalmente por vino blanco diluido (etanol).

La validación a escala industrial se realizó en la depuradora de aguas residuales de la cervecera Estrella de Galicia localizada en el polígono industrial de La Grela-Bens en la ciudad de A Coruña. La depuradora de Estrella de Galicia fue seleccionada para desarrollar este trabajo por los siguientes hechos:

- Utilización de un reactor EGSB de alta carga orgánica y tecnología avanzada
- Baja concentración de sólidos en suspensión en el efluente
- Localización cercana a la USC permitiendo el seguimiento periódico

A continuación se presenta una descripción de las instalaciones de la depuradora de Estrella de Galicia y del montaje experimental realizado.

Depuradora de aguas residuales industriales de la cervecera Estrella de Galicia

Las unidades que constituyen la depuradora son: tanque de homogenización, tanque de pre-acidificación y reactor anaerobio de lecho expandido con recirculación interna - EGSB-IC (Expanded Granular Sludge Blanket with Internal Circulation), la Figura 3.4 presenta una fotografía de la planta y la Figura 3.5 un esquema de la depuradora.

El sistema fue desarrollado e instalado por Biothane Systems, PAQUES. La depuradora inició su operación en agosto de 2001 y trata un caudal promedio de $80 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ con DQO de 3000 a $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, logrando eficacias de eliminación de DQO del 85 al 90 %.

El reactor EGSB-IC tiene forma cilíndrica y un volumen de 800 m^3 , con 26 m de altura y 6,5 m de diámetro. El caudal promedio de operación es de $200 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ ($120 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ de recirculación + $80 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ de alimentación). De esta manera la velocidad de carga orgánica (VOC) aplicada al sistema es de 6 a $9 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, la velocidad ascensional (Vs) es de $6 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ y el tiempo de retención hidráulico (TRH) de 10 h. La Tabla 3.3 presenta las principales características del agua residual cruda y tratada.



Figura 3.4. Vista general de la planta depuradora de aguas residuales industriales de la cervecera Estrella de Galicia.

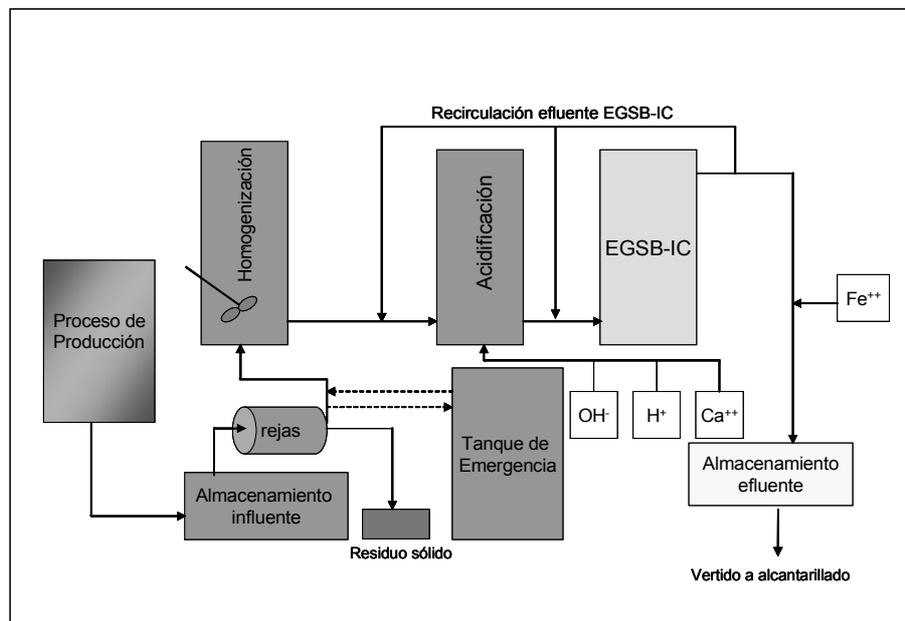


Figura 3.5. Esquema de la planta depuradora de aguas residuales industriales de la cervecera Estrella de Galicia.

Tabla 3.3. Características entrada/salida en la depuradora Estrella de Galicia.

Parámetro ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Influente	Efluente
DQO Total	3500	500
DQO Filtrada		250
SST	800	200
NTK	80	50
P	50	30
AGV		30

De las características del agua residual efluente de la depuradora se debe resaltar la presencia de iones de hierro y calcio, debido a la adición de los mismos para mejorar el funcionamiento del proceso. La presencia de dichos cationes pueden generar interferencias con el método Biomath 2; especialmente en la determinación de los fosfatos. Debido al aumento inicial del pH a 11, se puede presentar la precipitación de los cationes mencionados y de los fosfatos; afectando de esta manera a las determinaciones y generando problemas de obstrucción en el drenaje del equipo. Debido a lo anterior no se realizó la determinación de fosfatos.

Montaje experimental en la depuradora de la cervecera Estrella de Galicia

El ANASENSE® se instaló en un laboratorio anexo a la depuradora de Estrella de Galicia, la En la Figura 3.6 se presenta un esquema del montaje experimental

Validación de un sistema automático de monitorización de alcalinidad y ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios

utilizado para la toma de muestras y dosificación de los compuestos requeridos según el protocolo de validación.

Para mantener fresco el efluente de la depuradora, controlar los sólidos por sedimentación y desgasificarlo; se utilizó una línea derivada de la conducción del efluente. Alimentando con ella un recipiente con rebose, el sobre-nadante de dicho recipiente se bombea a caudal constante de $2,88 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (Q_1) al tanque de mezcla, del cual toma la muestra el analizador ANASENSE®.

Las soluciones estándar se alimentaron durante la simulación de la sobrecarga, al tanque de mezcla con un caudal de $0,24 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (Q_2), resultando una relación de dilución (Q_1/Q_2) de 13; para ello la solución estándar se preparó diariamente con una concentración 13 veces mayor que la concentración seleccionada en el protocolo de validación.

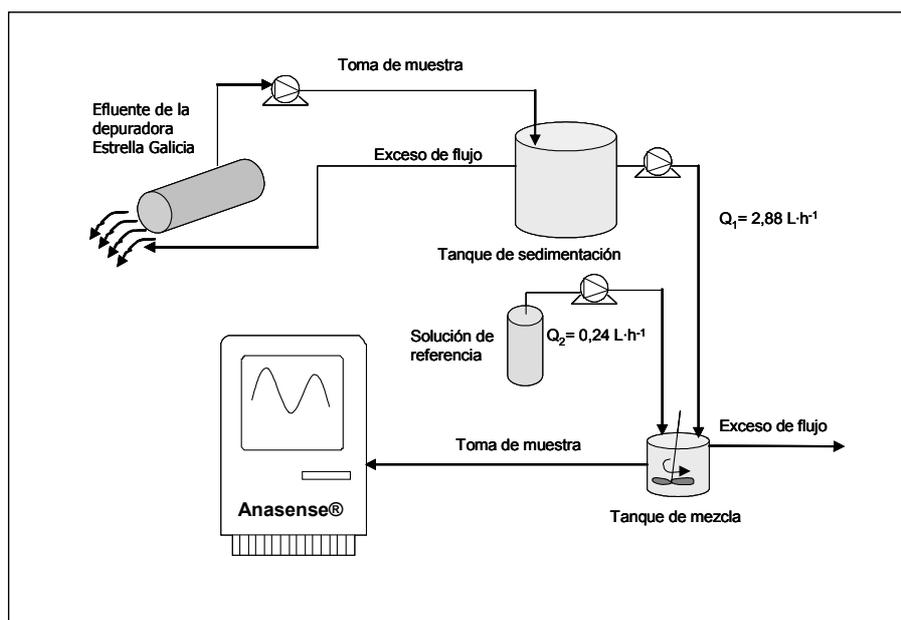


Figura 3.6. Esquema del montaje experimental en la depuradora industrial de Estrella de Galicia.

La concentración resultante de las diferentes sustancias tras la mezcla con el efluente puede sufrir variaciones frente a la concentración propuesta debido a cambios en la calidad del efluente. Sin embargo, estas desviaciones no alteran la validez del protocolo diseñado; debido a que las concentraciones alcanzadas por los

diferentes compuestos de interés al añadir la solución estándar son varios órdenes de magnitud mayores (5 a 10 veces) que las concentraciones de dichos compuestos en el efluente de la depuradora.

3.2.4 Protocolos de validación

Validación en Planta Piloto Anaerobia

La validación del ANASENSE® en la planta piloto se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se realizaron dos experimentos de sobrecarga; el primero de ellos se llevo acabo combinando sobrecarga orgánica y sobrecarga hidráulica, en el segundo solo se aplicó sobrecarga orgánica. Ambos experimentos generaron el incremento de la concentración de AGV y la disminución de la de bicarbonato, cubriendo un rango amplio de medición de ambos componentes (AGV de 0 a 4900 mg·L⁻¹ y Bicarbonato de 0 a 50 meq·L⁻¹). Dicha etapa se desarrolló en 400 horas de experimentación. En la segunda etapa se estudió la influencia del ensuciamiento del electrodo de pH sobre la estabilidad de las medidas. Esta etapa se realizó durante 240 horas de experimentación, aplicando un aumento gradual de la velocidad de carga orgánica. El protocolo utilizado en ambas etapas se muestra en la Figura 3.7.

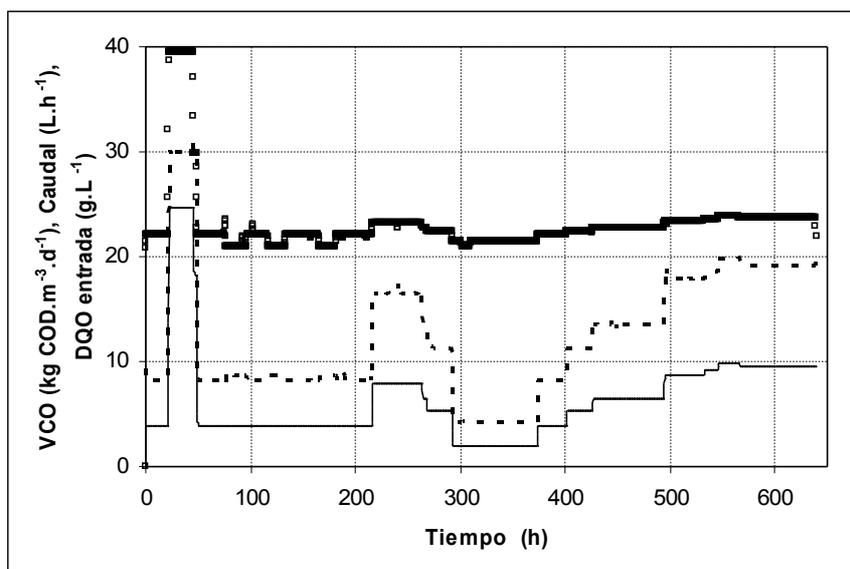


Figura 3.7. Evolución de la velocidad de carga orgánica-VCO (—), caudal de alimentación (□) y DQO de entrada (- -) durante la validación en planta piloto.

Validación en planta industrial

El protocolo utilizado en planta industrial se efectuó en dos fases. En la primera se realizó el seguimiento de las características del efluente de la depuradora; de esta

Validación de un sistema automático de monitorización de alcalinidad y ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios

manera se evaluó la estabilidad de las determinaciones y la autonomía del analizador para trabajar *on-line*.

Posteriormente se procedió a simular una sobrecarga orgánica, aumentando la concentración de AGV y disminuyendo la concentración de bicarbonato. Para simular la sobrecarga se añadieron en continuo diferentes cantidades de bicarbonato, ácido acético, ácido láctico y amonio al efluente de la depuradora. El experimento está orientado a evaluar el analizador y los métodos de interpretación con diferentes mezclas tampón y en diferentes niveles de concentración de los compuestos involucrados.

En la Tabla 3.4 se presentan las 10 condiciones utilizadas, simulando diferentes grados de sobrecarga orgánica (aumento de los ácidos acético y láctico y disminución del bicarbonato) con presencia o no de diferentes concentraciones de amonio y fosfato. Debido a restricciones de la operación de la depuradora, cada condición se aplicó durante un día, realizando análisis en continuo durante 10 horas. Para determinar los valores de referencia se recogió una muestra para cada condición, que se analizó posteriormente en el laboratorio.

Tabla 3.4. Protocolo de validación industrial del Ansense®, concentraciones deseadas en el efluente.

Condición	Bicarbonato de sodio (meq·L ⁻¹)	Ácido acético (mg·L ⁻¹)	Ácido láctico (mg·L ⁻¹)	Amonio (mg·L ⁻¹)
1	49	462	623	137
2	32	603	709	344
3	22	780	789	303
4	15	1016	1179	276
5	9,7	1324	1773	207
6	6,5	1719	2659	137
7	4,3	2234	2792	0
8	2,8	2939	2908	0
9	1,9	3779	3116	0
10	1,3	4912	3241	0

3.2.5 Métodos de valoración y análisis químico

Validación en Planta Piloto Anaerobia

El ANASENSE® utilizó para la determinación de AGV y bicarbonato los métodos: INRA, Applitek y Biomath1 (sin ajuste inicial de pH); métodos descritos en el apartado 3.2.2. Tanto el bicarbonato de referencia, como los AGV fueron calculados a partir de la concentración de carbono inorgánico total (TIC) y carbono orgánico total (TOC).

Para asegurar que el TOC medido correspondía principalmente a ácido acético; se determinaron por cromatografía gaseosa; aproximadamente cada 50 horas de experimentación; las concentraciones de los diferentes AGV (acético, propiónico y butírico) y del etanol en el efluente.

Validación en planta industrial

En su aplicación en planta industrial, el ANASENSE® estimó las concentraciones de AGV y bicarbonato por tres métodos: INRA, Biomath1 (sin ajuste de pH inicial) y Biomath2 (con ajuste de pH inicial a pH 11), descritos en el apartado 3.2.2. La concentración de AGV de referencia se calculó como la concentración de ácido acético equivalente, a partir de las concentraciones de los diferentes AGV determinadas por cromatografía de gases (ver apartado 2.1.1) y la concentración de bicarbonato fue calculada a partir del carbono inorgánico total (TIC) asumiendo que todo el carbono inorgánico se aporta por el bicarbonato.

El ANASENSE® determinó el nitrógeno amoniacal mediante el método Biomath2 (con ajuste de pH inicial hasta pH 11). Como referencia se determinó en el laboratorio el NTK de acuerdo con el método descrito en el apartado 2.1.1. La estimación de la concentración de ácido láctico se realizó utilizando los métodos Biomath1 y Biomath2 (con y sin ajuste de pH inicial hasta pH 11). El valor de referencia para ácido láctico se estimó a partir de un balance de TOC, restando al TOC total el TOC de los AGV y asignando dicha diferencia al TOC correspondiente al ácido láctico.

3.2.6 Regresión lineal simple

A continuación se presenta una breve explicación sobre la regresión lineal simple, herramienta utilizada en la validación de los diferentes métodos de estimación de AGV y bicarbonato, estudiados en este trabajo.

Consideremos una variable aleatoria respuesta (o dependiente) Y , que supondremos relacionada con otra variable (no necesariamente aleatoria) que llamaremos explicativa, predictora o independiente y que se denotará por X . A partir de una muestra de n individuos para los que se dispone de los valores de ambas variables, se puede visualizar gráficamente la relación existente entre ambas mediante un gráfico de dispersión, en el que los valores de la variable X se disponen en el eje horizontal y los de Y en el vertical. La metodología de la regresión lineal simple consiste en encontrar la recta que mejor se ajuste a la nube de puntos del diagrama así dibujado. La ecuación general de la recta de regresión será entonces de la forma:

$$Y = a + b \cdot X + \varepsilon \quad (\text{Ec.3.5})$$

Donde:

a : valor de la variable dependiente Y cuando $X = 0$

b : pendiente de la recta de regresión

ε : error

En general se utiliza el método de mínimos cuadrados, que elige como recta de regresión a aquella que minimiza las distancias verticales de las observaciones a la recta. Los estimadores mínimo cuadráticos de los coeficientes de la recta de regresión son:

$$\hat{b} = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

$$\hat{a} = \bar{Y} - \hat{b} \cdot \bar{X} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

Donde:

\bar{X} : media muestral de la variable X

\bar{Y} : media muestral de la variable Y

S_{xy} : covarianza muestral de las variables X y Y

S_{xx} : varianza muestral de la variable X

El valor de b servirá como un indicador del sentido de asociación entre ambas variables: así, nos $b > 0$ indicará una relación directa entre ellas, $b < 0$ delatará una relación de tipo inverso, mientras que $b = 0$ nos indica que no existe una relación lineal clara entre ambas variables. Así mismo, y tal y como se deduce de la ecuación de la recta de regresión, el coeficiente b nos da una estimación del cambio por término medio en la variable Y por cada unidad en que se incrementa X . El Coeficiente de correlación de Pearson (r): indica la fuerza de la relación entre las dos variables (toma valores entre 1 y -1) y se calcula con la ecuación 3.8.

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x \cdot S_y} \quad (\text{Ec.3.8})$$

Donde:

S_x : desviación típica muestral de X

S_y : desviación típica muestral de Y

Capítulo 3

El Coeficiente de determinación (R^2), indica cual es la proporción de la variación en la variable dependiente (Y) que puede explicarse a partir de la variación en la variable independiente (X). Además indica el porcentaje de ajuste logrado con el modelo lineal (bondad del ajuste). En las regresiones lineales simples se utiliza usualmente el coeficiente R^2 para expresar además de la bondad del ajuste y la fuerza de la relación entre las dos variables; debido a que el coeficiente R^2 se calcula elevando al cuadrado el coeficiente r . Por lo tanto el valor absoluto del coeficiente r siempre será mayor que el valor de R^2 .

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Validación en planta piloto

Comportamiento del analizador

El analizador operó en forma continua durante 60 días sin presentar ningún problema. Un aspecto fundamental para el buen funcionamiento del equipo fue el control de sólidos en la muestra a analizar, evitando obstrucciones y depósitos tanto en los conductos como en el vaso de análisis; el control de sólidos se realizó mediante microfiltración utilizando una membrana cilíndrica de filtración tangencial con diámetro de corte de 0,80 μm . Durante las primeras 400 horas de experimentación (primera fase) se limpió diariamente el electrodo de pH; posteriormente en la segunda fase de experimentación no se realizó dicha limpieza con el fin permitir el ensuciamiento del electrodo de pH y estudiar la estabilidad del analizador en esta condición.

Comportamiento de los métodos de análisis de AGV y Alcalinidad utilizados por el analizador

En la Figura 3.8 se presenta la evolución de la concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) estimada por las diferentes metodologías. la Tabla 3.5 muestra la comparación entre los AGV de referencia (medidos a partir del TOC) y los AGV medidos por cromatografía aproximadamente cada 50 horas de experimentación con el fin de asegurar la validez de la medida de referencia.

En la Tabla 3.5 se observa que tanto el promedio como la desviación estándar de las concentraciones del ácido acético de referencia calculadas a partir del TOC se ajustan adecuadamente a las determinadas por cromatografía gaseosa cada 50 horas de experimentación. Adicionalmente, de acuerdo con las mediciones realizadas por cromatografía de gases, las concentraciones de AGV diferentes al ácido acético y de etanol se mantuvieron por debajo de 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente durante los dos períodos de mayor sobrecarga orgánica (50-100 h y 250-350 h).

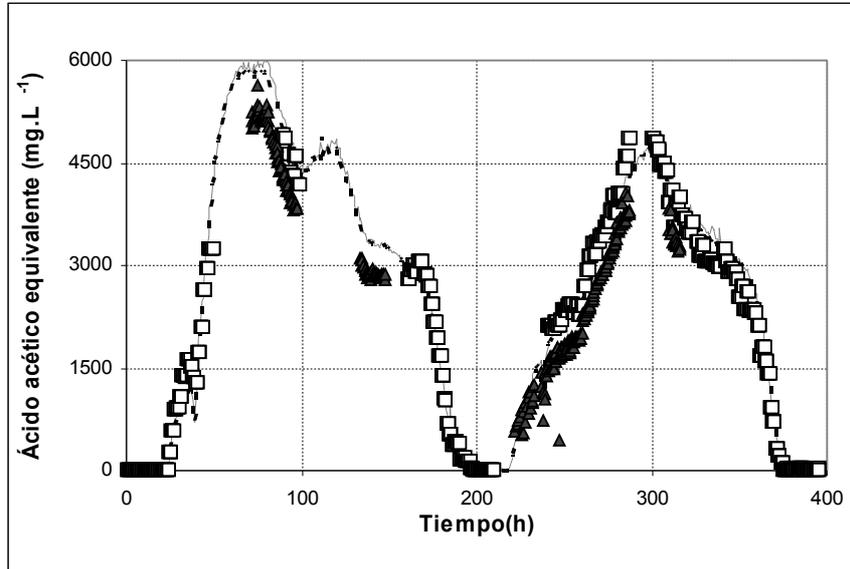


Figura 3.8. Evolución de la concentración de AGV durante la sobrecarga orgánica, valores de referencia (\square), INRA (—), Applitek (— · —), Biomath 1 (\blacktriangle).

Tabla 3.5. Comparación ácido acético equivalente calculado con el TOC y determinado por cromatografía.

Tiempo (h)	Ácido acético equivalente (TOC) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ácido acético por cromatografía ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
40-50	1594±267	1600±231
80-90	4760±131	4680±192
170-180	2554±503	2575±360
195-205	194±28	233±10
260-270	2653±219	2640±178
280-290	4089±209	4105±110
330-340	3120±145	3480±387

En la Figura 3.9 se muestra la evolución de la concentración de bicarbonato estimada por los diferentes métodos para la fase de sobrecarga orgánica (0 a 400 horas). Los métodos Applitek e INRA cubrieron adecuadamente todo el rango de experimentación; mientras que el método Biomath1 solo cubrió parcialmente el rango de experimentación, debido a que el algoritmo utilizado por el analizador realizó el procedimiento de valoración en forma rápida, generando curvas con muy pocos puntos, impidiendo así la aplicación correcta del método Biomath1, que se fundamenta en el perfil de la capacidad tampón.

Los datos obtenidos en la fase de sobrecarga orgánica (0-400 horas) se analizaron mediante regresión lineal, evaluando el ajuste de cada método utilizado por el analizador con respecto al valor de referencia. Se realizó el ajuste para todo el rango de experimentación (0 a 4900 mg·L⁻¹ para los AGV y 0 a 49,5 meq·L⁻¹ para el bicarbonato) y adicionalmente, con el fin de evaluar la sensibilidad de los métodos, se estudió el rango de concentraciones bajas (0 a 410 mg·L⁻¹ para los AGV y 0 a 10,2 meq·L⁻¹ para el bicarbonato).

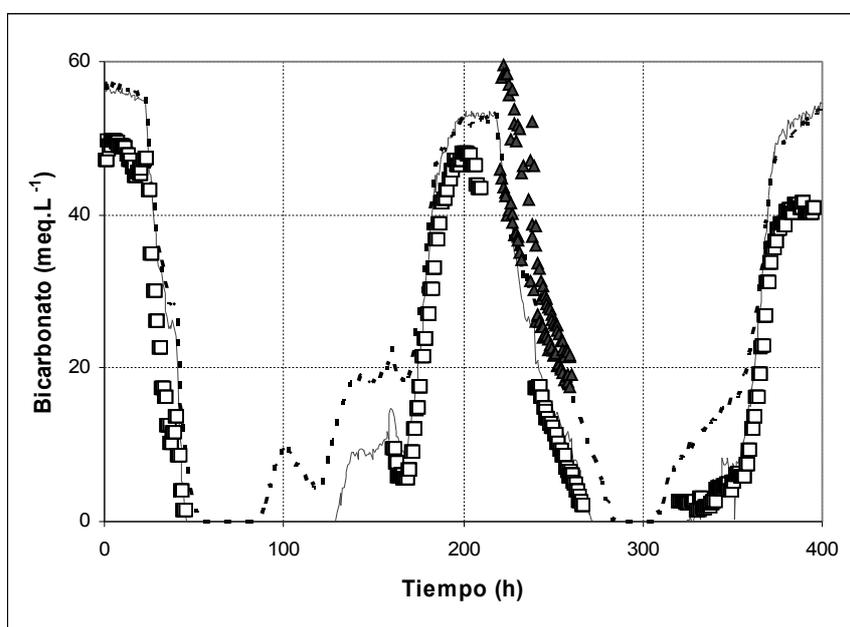


Figura 3.9. Evolución de las concentraciones de bicarbonato durante la fase de sobrecarga orgánica, valores de referencia (□), INRA (—), Applitek (---), Biomath 1 (▲).

En las Figuras 3.10 y 3.11 se muestran las regresiones lineales correspondientes a los AGV y bicarbonato para el rango total de concentraciones estudiadas. En la determinación de AGV, los métodos INRA y Applitek presentan buenos resultados, con coeficientes de determinación mayores que 0,98 y pendientes cercanas a 1, proporcionando el método INRA una menor ordenada en el origen.

El método Biomath1, a pesar de la valoración rápida realizada por el analizador, presenta un buen coeficiente de determinación y una pendiente de 0,96

en el rango de 2100 a 4900 mg·L⁻¹. Sin embargo el valor de la ordenada en el origen es de - 398 meq·L⁻¹, por lo tanto el método presenta una desviación constante (de fácil corrección) con respecto a los datos de referencia.

Los métodos Applitek e INRA valoraron adecuadamente el bicarbonato para todo el rango de concentraciones, con coeficientes de determinación cercanos a 1. El método Applitek presenta la mejor pendiente con valor de 1,03; mientras que la pendiente de la regresión lineal para el método INRA tiene un valor de 1,18.

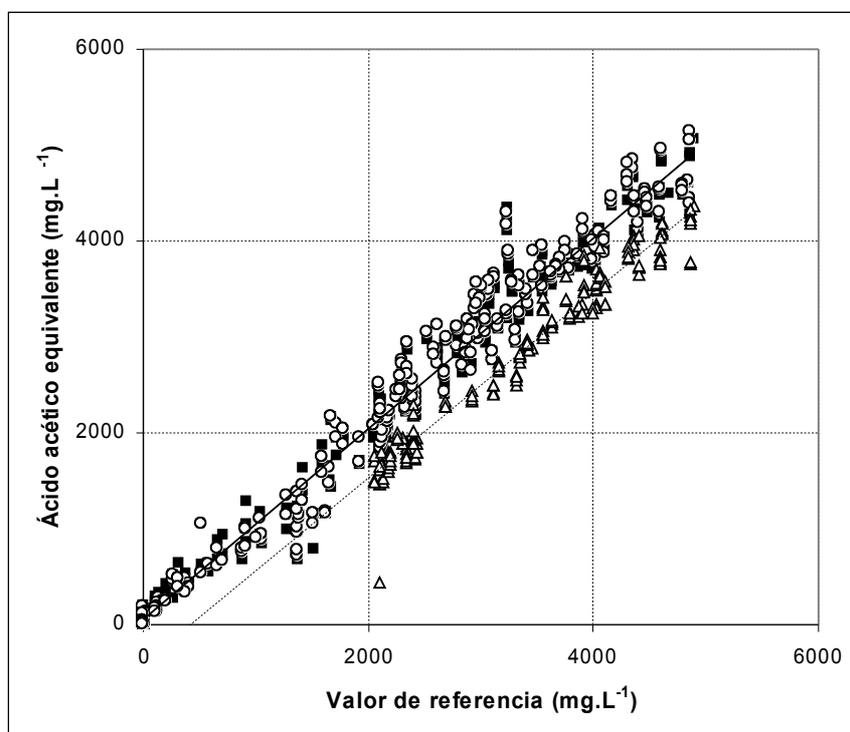


Figura 3.10. Regresión lineal para las concentraciones de AGV estimadas por los métodos INRA (○), Applitek (■), Biomath 1 (△) frente a las concentraciones de referencia. $AGV(INRA)=1,01 \cdot AGV(Ref)+15$ ($R^2=0,98$); $AGV(Applitek)=0,98 \cdot AGV(Ref)+41$ ($R^2=0,98$); $AGV(Biomath1)=0,96 \cdot AGV(Ref)-398$ ($R^2=0,96$).

El algoritmo de cálculo para el bicarbonato en el método Biomath1 se inicializa cuando el pH inicial de la muestra está por encima de 6,3; esto es debido a que el pKa del bicarbonato se sitúa en 6,35. Durante el desarrollo de las dos sobrecargas orgánicas, cuando el pH tomó valores por debajo de 6,3 el método Biomath1 no

estimó la concentración de bicarbonato al no cumplirse la condición de pH mínimo. Debido a esta situación el método Biomath1 solo realizó estimaciones en el rango de concentraciones de bicarbonato de 5,7 a 17,4 meq·L⁻¹, presentando un coeficiente de determinación bajo de 0,63.

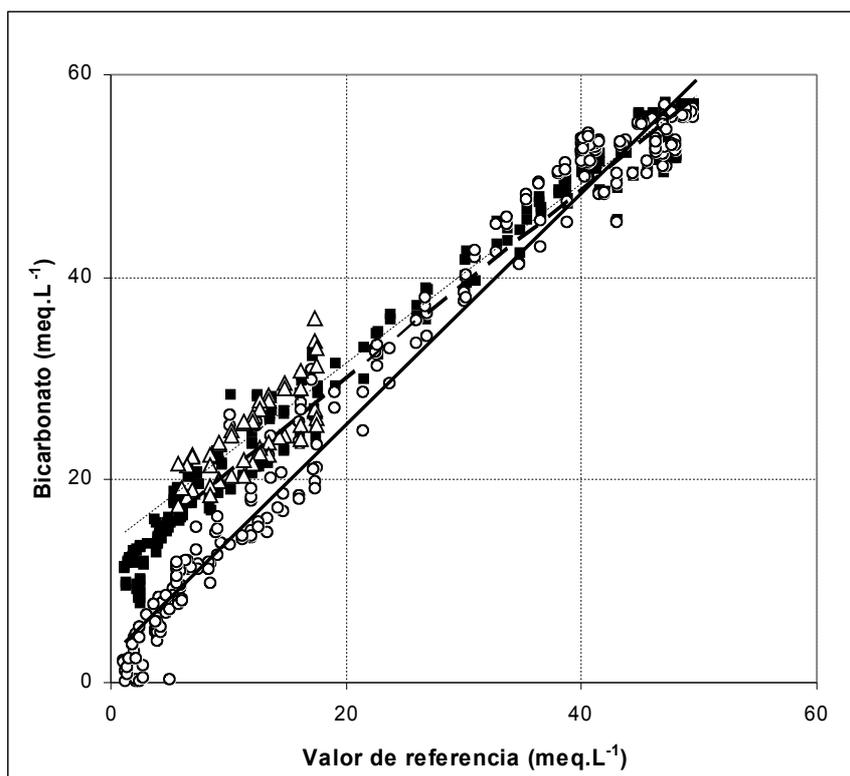


Figura 3.11. Regresión lineal para las concentraciones de bicarbonato estimadas por los métodos INRA (○), Applitek (■), Biomath 1 (△) frente a las concentraciones de referencia. $BIC(INRA)=1,18 \cdot BIC(Ref)+1$ ($R^2=0,98$); $BIC(Applitek)=1,03 \cdot BIC(Ref)+8$ ($R^2=0,96$); $BIC(Biomath1)=0,89 \cdot BIC(Ref)+14$ ($R^2=0,63$).

En las Figuras 3.12 y 3.13 se muestran las regresiones lineales para AGV y bicarbonato en el rango de concentraciones bajas (0 a 410 mg·L⁻¹ para AGV y 0 a 10,2 meq·L⁻¹ para bicarbonato). En el rango de concentraciones bajas de AGV, los métodos Applitek e INRA presentan resultados aceptables con coeficientes de determinación de 0,80 y 0,87 y pendientes de 1,16 y 1,12 respectivamente.

De acuerdo con los resultados de este experimento; el método Applitek, diseñado para evaluar con mayor exactitud concentraciones bajas de AGV, no presenta mejores resultados que el método INRA. Sin embargo debe indicarse que

se analizaron pocos datos de AGV en el rango de bajas concentraciones, debido a que la validación se realizó evaluando dos sobrecargas orgánicas y, por tanto, la concentración de AGV obtenida en el efluente del reactor estaba generalmente por encima de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato equivalente.

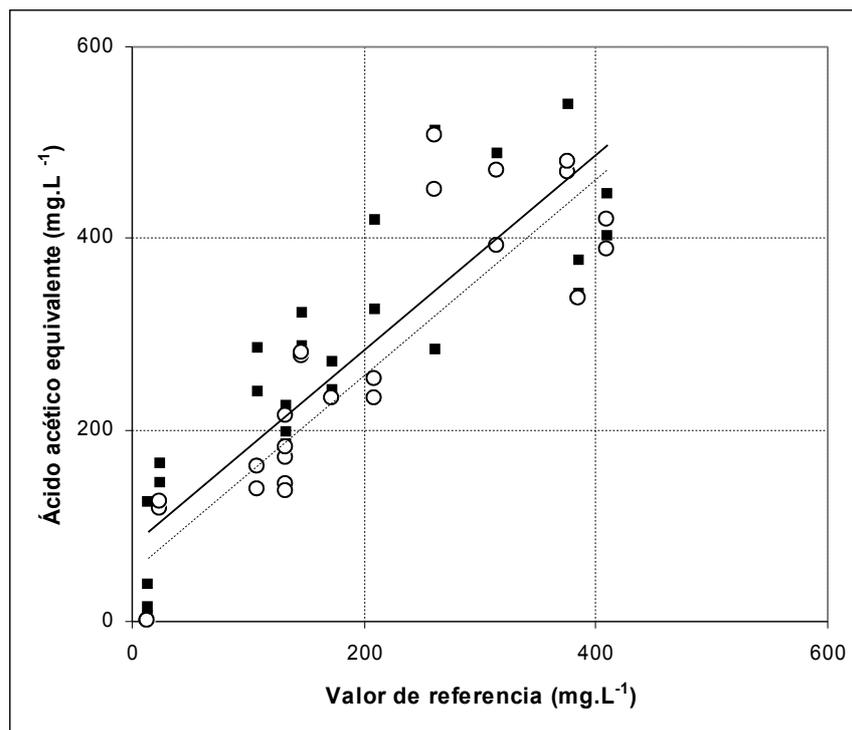


Figura 3.12. Regresión lineal para las concentraciones de AGV menores a $410 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, estimadas por los métodos INRA (○) y Applitek (■) frente a las concentraciones de referencia. $\text{AGV}(\text{INRA})=1,12\cdot\text{AGV}(\text{Ref})+25$ ($R^2=0,87$); $\text{AGV}(\text{Applitek})=1,16\cdot\text{AGV}(\text{Ref})+51$ ($R^2=0,80$).

Los resultados proporcionados por el método Biomath1 no se analizaron, por no disponer de suficientes datos en el rango de bajas concentraciones de AGV y bicarbonato, debido a la velocidad con que se realizaron las valoraciones. Al no disponer de suficientes puntos de medición; no fue posible la construcción de las curvas de capacidad tampón, que son fundamentales para aplicar dicho método.

En el rango de concentraciones de bicarbonato menores de $10 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$, el método INRA presentó los mejores resultados para la estimación de las concentraciones de bicarbonato con un coeficiente de determinación de 0,86 y una pendiente de 1,88. Los datos estimados por la metodología Applitek muestran un

coeficiente de determinación más pobre de 0,74 y una pendiente de 1,74. Ambos métodos presentan para este rango de concentraciones, una sobreestimación importante de la concentración de bicarbonato.

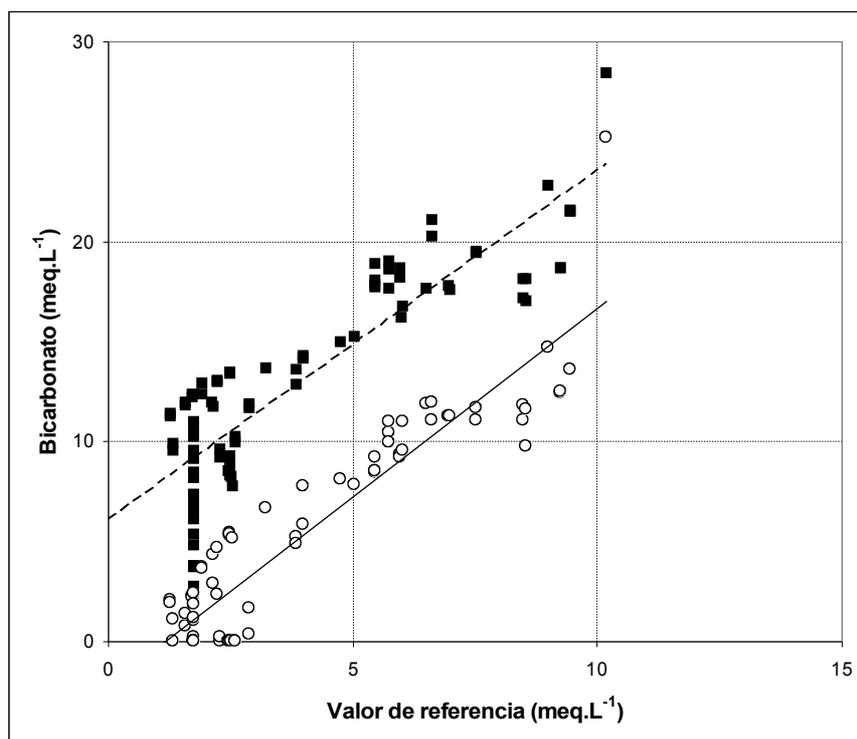


Figura 3.13. Regresión lineal para las concentraciones de bicarbonato menores de 10 meq·L⁻¹ estimadas por los métodos INRA (○) y Applitek (■) frente a las concentraciones de referencia. $BIC(INRA)=1,88 \cdot BIC(Ref)-2$ ($R^2=0,86$);
 $BIC(Applitek)=1,74 \cdot BIC(Ref)+6$ ($R^2=0,74$).

En las Tablas 3.6 y 3.7, a modo de resumen; se presentan para AGV y bicarbonato respectivamente, los valores de coeficiente de regresión, pendiente y ordenada en el origen para cada uno de los métodos evaluados en la fase de sobrecarga orgánica; cubriendo todo el rango de concentraciones.

Capítulo 3

Tabla 3.6. Parámetros de las regresiones para los diferentes métodos de estimación de AGV durante la fase de sobrecarga orgánica, para todo el rango de concentraciones.

Método	Rango de concentraciones (mg·L ⁻¹)	R ²	Pendiente	Ordenada en el origen (mg·L ⁻¹)
INRA	0-4900	0,98	1,01	15
Applitek	0-4900	0,98	0,98	41
Biomath1	2100-4900	0,96	0,96	-398

Tabla 3.7. Parámetros de las regresiones para los diferentes métodos de estimación de bicarbonato durante la fase de sobrecarga orgánica, para todo el rango de concentraciones.

Método	Rango de concentraciones (meq·L ⁻¹)	R ²	Pendiente	Ordenada en el origen (meq·L ⁻¹)
INRA	0-49,5	0,98	1,18	1
Applitek	0-49,5	0,96	1,03	8
Biomath1	5,7 -17,4	0,63	0,89	14

Para evaluar la robustez del analizador y el efecto del ensuciamiento del sensor de pH en la estimación de AGV y bicarbonato, se estudió la respuesta de los métodos Applitek e INRA en la segunda fase de experimentación (400-640 h). Con el fin de obtener resultados representativos se evaluaron ambas metodologías durante las últimas 50 horas de esta fase (590-640 h), una vez transcurrido un período de ensuciamiento apreciable del sensor de pH (190 horas).

En las Figuras 3.14 y 3.15 se presentan la evolución de las concentraciones de AGV y de bicarbonato durante el experimento de ensuciamiento del sensor de pH. En las tablas 3.8 y 3.9 se muestran los parámetros de las regresiones lineales para los métodos INRA y Applitek, obtenidos en este experimento.

En la Figura 3.14 se puede observar que las estimaciones de los AGV realizadas por ambos métodos, responden de forma similar frente al ensuciamiento del sensor de pH. Mostrando los valores estimados mayores diferencias con respecto a los valores de referencia a medida que aumenta el tiempo y por ende el ensuciamiento. Ambas metodologías (INRA y Applitek), presentan coeficientes de determinación adecuados, 0,94 y 0,97 respectivamente y valores bajos en las pendientes (0,63 y 0,61 respectivamente). Lo que indica que ambas metodologías debido al ensuciamiento, estiman una concentración de AGV aproximadamente un 40 % menor que la concentración de referencia. En el método INRA dicha subestimación se enmascara debido al valor de la ordenada en el origen (543 mg·L⁻¹).

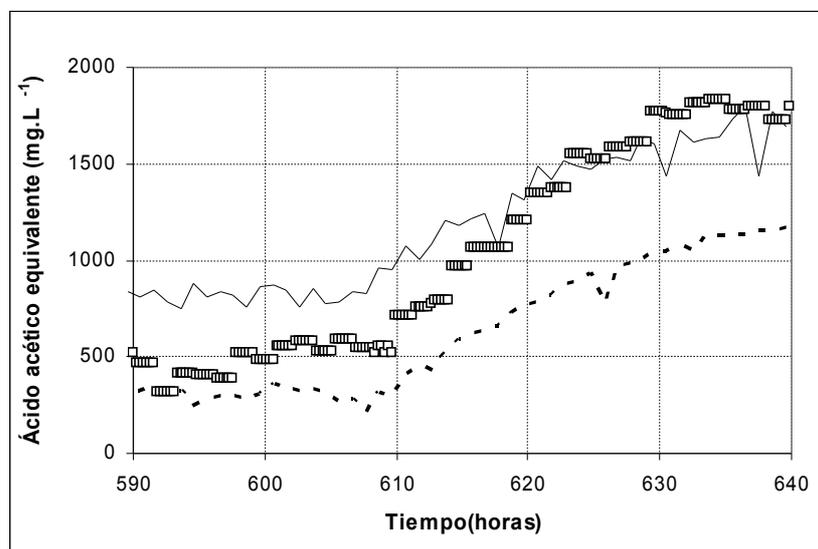


Figura 3.14. Evolución de la concentración de AGV durante la fase de ensuciamiento del sensor de pH, valores de referencia (□), INRA (—), Applitek (---).

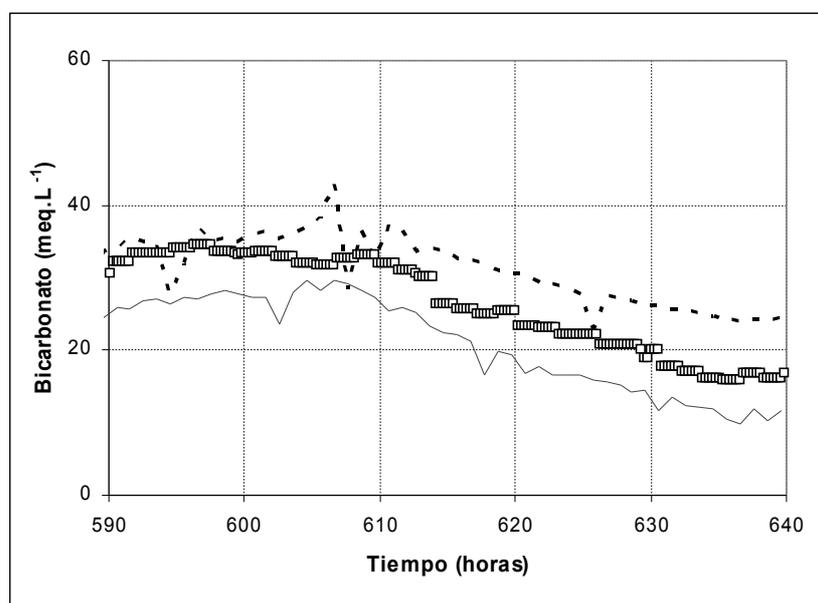


Figura 3.15. Concentración de bicarbonato durante la fase de ensuciamiento del sensor de pH, valores de referencia (□), INRA (—), Applitek (---).

Tabla 3.8. Parámetros de las regresiones lineales para los diferentes métodos de estimación de AGV durante la fase de ensuciamiento del sensor de pH.

Método	Rango de concentraciones (mg·L ⁻¹)	R ²	Pendiente	Ordenada en el origen (mg·L ⁻¹)
INRA	300-1800	0,94	0,63	543
Applitek		0,97	0,61	3

En la determinación del bicarbonato, el ensuciamiento afecta en mayor medida al método Applitek, especialmente a partir de las 610 horas de experimentación, esto se refleja en los valores del coeficiente de determinación (0,75) y de la pendiente (0,64). Por su parte la metodología INRA estima adecuadamente las concentraciones de bicarbonato a pesar del ensuciamiento, así lo demuestran los valores de 0,96 y 0,95 respectivamente para el coeficiente de determinación y la pendiente.

Tabla 3.9. Parámetros de las regresiones para los diferentes métodos de estimación de bicarbonato durante la fase de ensuciamiento del sensor de pH

Método	Rango de concentraciones (meq·L ⁻¹)	R ²	Pendiente	Ordenada en el origen (meq·L ⁻¹)
INRA	15-35	0,96	0,95	5
Applitek		0,75	0,64	14

Relación de alcalinidades (AI/AT y AI/AP)

El analizador automático ANASENSE®, determinó durante la fase de sobrecarga además de las concentraciones de AGV y alcalinidad bicarbonática, los valores de la alcalinidad parcial (AP) y alcalinidad intermedia (AI). En la Figura 3.16 se muestra la evolución de los valores de las relaciones AI/AT, AI/AP y de la concentración equivalente de acetato durante las dos sobrecargas orgánicas.

Ambas relaciones presentan un comportamiento similar; si bien debido a que $AP \leq AT$, la relación AI/AP presenta mayor sensibilidad frente al aumento del valor de la alcalinidad intermedia (AI) correspondiente a la alcalinidad aportada por los AGV.

De acuerdo con este trabajo experimental, una operación segura del digestor anaerobio, sin acumulación de AGV, se logra manteniendo las relaciones AI/AT y AI/AP en valores de aproximadamente 0,2 y 0,25 respectivamente (ver Figura 3.16). Ambos valores concuerdan con el umbral de 0,3 definido por Ripley *et al.* (1986).

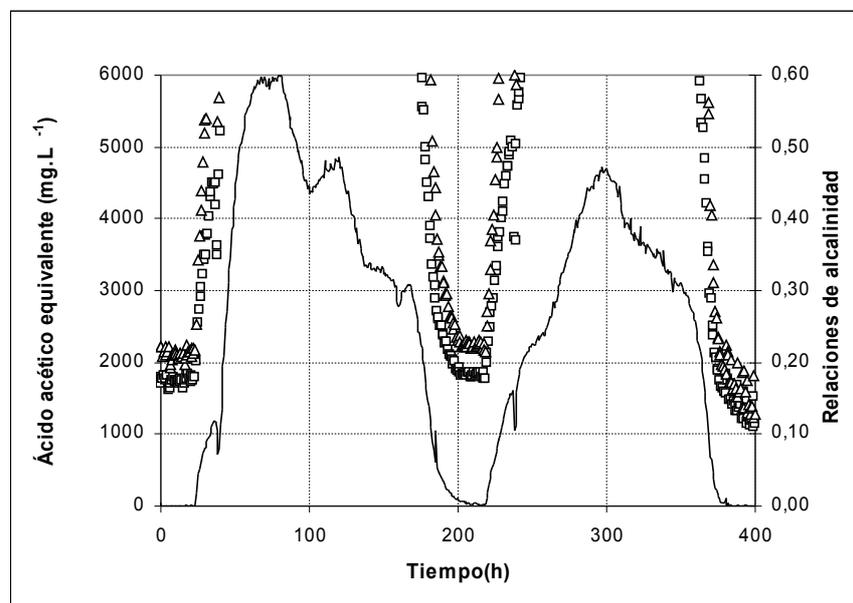


Figura 3.16. Evolución de la concentración de AGV por el método INRA (—) y de las relaciones AI/AT (□) y AI/AP (△) durante las dos sobrecargas orgánicas.

3.3.2. Validación en planta industrial

Comportamiento del analizador

Inicialmente se comprobó el comportamiento del analizador frente al efluente de la depuradora de aguas residuales de fabricación de cerveza. En esta etapa el analizador operó en forma continua durante 60 días. Se presentaron fallos relacionadas con obstrucción por sólidos y/o precipitados en el drenaje del vaso de valoración, daños en la bomba de drenaje, inestabilidad y daño del electrodo de pH y por último fallos en la bureta de precisión que dosifica la solución de valoración.

Los problemas descritos tuvieron lugar durante los primeros 30 días de la validación a escala industrial. Una vez corregidos los fallos y adoptado un protocolo de limpieza, se realizó el experimento de simulación de la sobrecarga orgánica.

La presencia de sólidos en el efluente de la depuradora, junto a la posible precipitación de sustancias causada por la dosificación de ión férrico, son las principales causas de obstrucción del drenaje del vaso de valoración y posterior daño de la bomba de drenaje. Queda claro que la operación del analizador es muy sensible a la presencia de sólidos y/o precipitados en el efluente a estudiar. La obstrucción del drenaje del vaso de valoración impide la renovación adecuada de la

muestra a analizar y así la muestra se diluye con el agua de lavado o con restos de otra muestra anterior, introduciendo por tanto una enorme causa de error.

El otro problema recurrente consistió en la presencia de burbujas de aire en la bureta de precisión utilizada para inyectar la solución de valoración. Las burbujas de aire ocasionan error en el registro del volumen de ácido utilizado en la valoración de la muestra, por lo que el equipo registra un valor de volumen de ácido añadido mayor al valor real, estimando, por tanto, un mayor valor para la alcalinidad de la muestra.

Comportamiento de los métodos de análisis de AGV y Alcalinidad utilizados por el analizador

Siguiendo con el protocolo de validación presentado en el apartado 3.2.4, se procedió a simular una sobrecarga orgánica, utilizando como matriz el efluente de la depuradora. Se aplicaron las 10 condiciones consignadas en la tabla 3.4, repitiendo la condición 1 al final de la experimentación con el fin de evaluar la consistencia y estabilidad de los ensayos; esta condición se denominó condición 11.

En la validación en planta industrial se utilizaron los métodos INRA y Biomath 1 y 2. El método Biomath 2 requiere de aproximadamente 60 minutos para su ejecución, al realizarse una valoración detallada partiendo de pH 11.

Para cada condición aplicada se realizó la comparación de los valores on line registrados por el analizador con los valores de referencia analizados en laboratorio a partir de la muestra tomada diariamente. La desviación entre ambos resultados permite evaluar el funcionamiento del analizador, aunque debido a las condiciones de experimentación se deben señalar otros factores, enumerados a continuación, que contribuyen a la desviación de los resultados frente al valor de referencia determinado en el laboratorio:

- Variaciones en las características del efluente de la depuradora
- Precipitación de cationes en el tanque de mezcla y en el vaso de valoración
- Ruido en los datos de valoración
- Desviaciones en los métodos de medida

La utilización de regresiones lineales como herramienta de análisis de los datos presenta algunas limitaciones. Por un lado existe una restricción inicial pues solo se cuenta con una medida de referencia para cada condición, mientras que el valor asignado a cada metodología es el promedio de las determinaciones realizadas durante 10 horas (4 a 10 medidas para cada condición).

Por otro lado, según los resultados obtenidos, la desviación con respecto a la medida de referencia es mayor para las concentraciones mayores y disminuye para las concentraciones menores, por lo que el error no está normalmente distribuido

Validación de un sistema automático de monitorización de alcalinidad y ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios

para los datos experimentales. En realidad solo se esperarían cambios en la medida con respecto al incremento de la concentración por incremento de la actividad iónica de las soluciones valoradas, debiéndose reflejar dicho efecto en la pendiente de la línea de regresión.

El valor de la ordenada en el origen (valor estimado por cada método cuando el valor de referencia es cero) para las circunstancias en que se realizó el experimento (utilizando como matriz el efluente de la depuradora) está fuertemente influenciado por la variabilidad en el efluente de la depuradora durante el tiempo de duración de cada experimento (aproximadamente 10 horas), debido a esto dicho valor no se utilizará en el análisis de resultados.

El coeficiente de determinación R^2 , refleja el ruido presente en cada determinación, ruido que esta influenciado tanto por el error en la medida, como por los cambios dinámicos que tuvieron lugar durante la experimentación, en definitiva los valores del coeficiente de determinación R^2 deben analizarse bajo esta doble óptica.

En la Tabla 3.10 se muestran los valores estimados de la concentración de bicarbonato, en la tabla se comparan, para cada condición, los valores de referencia con los promedios diarios de los valores medidos por cada uno de los métodos *on-line* utilizados. En todos los casos se produce un comportamiento ajustado a la tendencia de los valores de referencia, obteniendo la mejor respuesta en el rango de 20 a 30 meq·L⁻¹ (condiciones 2 a 5).

Tabla 3.10. Concentraciones promedio de bicarbonato estimadas por cada método frente a concentraciones de referencia (meq·L⁻¹).

Condición	Valor de Referencia	Promedio y desviación estándar de los valores estimados por cada método y para cada condición de experimentación		
		INRA	Biomath1	Biomath2
1	49,7	46,1 ± 2,4	42,1 ± 5,3	30,4 ± 1,4
2	33,8	36,7 ± 1,5	30,1 ± 4,3	36,4 ± 2,5
3	24,6	24,5 ± 1,4	28,7 ± 1,2	29,1 ± 1,8
4	20,0	18,6 ± 3,2	25,8 ± 3,3	25,0 ± 7,4
5	20,3	21,3 ± 3,9	24,3 ± 2,3	26,5 ± 3,9
6	15,6	7,7 ± 3,3	18,8 ± 1,1	18,4 ± 0,9
7	14,4	7,0 ± 2,2	18,6 ± 2,8	16,9 ± 0,3
8	10,0	2,9 ± 2,5	17,2 ± 2,5	14,5 ± 0,8
9	5,9	0,0 ± 0,0	15,0 ± 0,6	12,8 ± 2,4
10	7,4	1,2 ± 1,6	19,2 ± 1,4	16,2 ± 1,0
11	45,5	49,8 ± 2,8	53,2 ± 2,9	50,0 ± 3,4

Los resultados obtenidos con los métodos Biomath 1 y Biomath 2 muestran un comportamiento similar para todas las condiciones exceptuando la condición 1, para

la cual el método Biomath 2 subvalora en aproximadamente un 30 % la concentración de bicarbonato con respecto al valor de referencia.

A concentraciones de bicarbonato en el rango de 6 a 20 meq.L⁻¹ (condiciones 6 a 10), el método INRA arroja valores ligeramente por debajo de los valores de referencia; mientras que los métodos Biomath1 y Biomath2 presentan resultados por encima de los valores de referencia. Los parámetros de la regresión lineal entre el valor de referencia de la concentración de bicarbonato y los valores estimados por los diferentes métodos se muestran en la Figura 3.17.

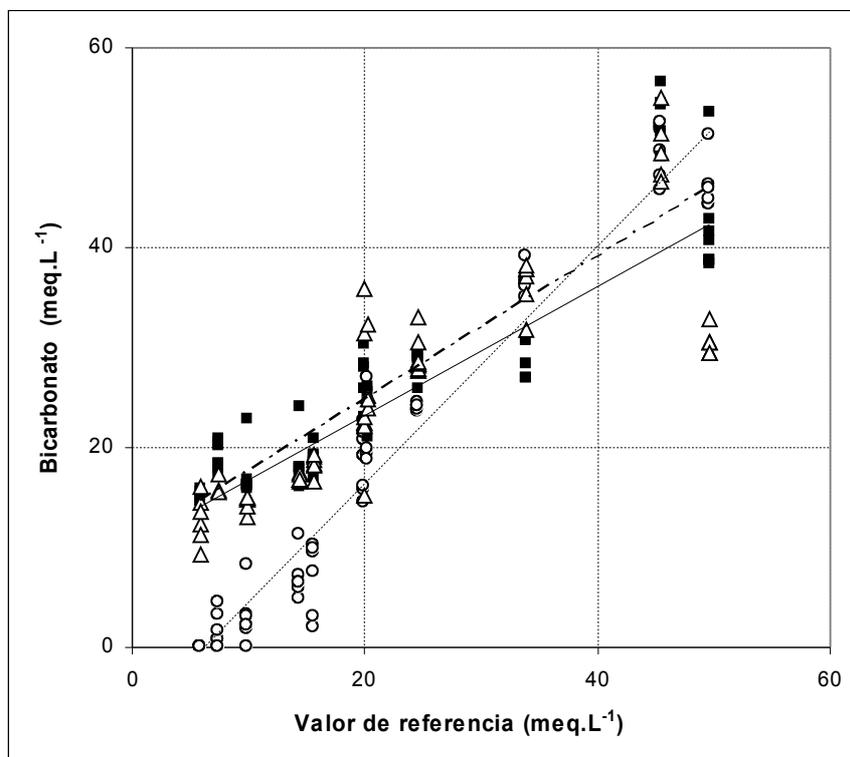


Figura 3.17. Regresión lineal para las concentraciones de bicarbonato estimadas por los métodos INRA (○), Biomath1 (■), Biomath2 (△) frente a las concentraciones de referencia. $BIC(INRA)=1,19 \cdot BIC(Ref)-7$ ($R^2=0,95$); $BIC(Biomath1)=0,72 \cdot BIC(Ref)+10$ ($R^2=0,83$); $BIC(Biomath2)=0,65 \cdot BIC(Ref)+10$ ($R^2=0,69$).

El método INRA presenta el mejor ajuste lineal en la estimación de la concentración de bicarbonato, con un coeficiente de determinación de 0,95 y una pendiente de 1,19. Los métodos Biomath 1 y Biomath 2 presentan coeficientes de determinación más pobres, 0,83 y 0,69 respectivamente; la estimación de la concentración de bicarbonato se subvalora por ambos métodos.

Validación de un sistema automático de monitorización de alcalinidad y ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios

En la Tabla 3.11 se presenta la comparación entre los valores de referencia y los calculados por los diferentes métodos utilizados para los AGV. En general, los tres métodos estiman adecuadamente el aumento en la concentración de AGV. La mejor respuesta con los métodos evaluados se obtiene para valores inferiores a $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (condiciones 1 a 5).

Tabla 3.11. Concentraciones promedio de AGV estimadas por cada método frente a concentraciones de referencia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Condición	Valor de Referencia	Promedio y desviación estándar de los valores estimados por cada método y para cada condición de experimentación		
		INRA	Biomath1	Biomath2
1	447	627 ± 26	287 ± 38	520 ± 185
2	602	582 ± 12	468 ± 36	495 ± 32
3	830	939 ± 9	722 ± 274	541 ± 70
4	1166	1324 ± 203	932 ± 215	640 ± 119
5	1079	1550 ± 217	1031 ± 153	1450 ± 478
6	1775	2058 ± 316	1106 ± 312	1133 ± 84
7	2473	2472 ± 65	1602 ± 86	1526 ± 326
8	2790	3167 ± 273	2195 ± 143	2251 ± 316
9	3690	3808 ± 259	2517 ± 311	2694 ± 315
10	4263	4924 ± 143	3493 ± 235	3119 ± 629
11	833	661 ± 86	516 ± 233	500 ± 37

A partir de valores cercanos a $2000 \text{ mg AGV}\cdot\text{L}^{-1}$, el método INRA sobrevalora ligeramente la concentración de AGV, mientras que los métodos Biomath 1 y Biomath 2 subvaloran las concentraciones de AGV con respecto al valor de referencia.

En la figura 3.18 se muestran las regresiones lineales de las concentraciones de AGV estimadas por cada método frente a las concentraciones de referencia. Nuevamente el método que presenta mejor ajuste es el método INRA con coeficiente R^2 de 0,97 y pendiente de 1,10. Los métodos Biomath1 y Biomath2 presentan respectivamente coeficientes de determinación de 0,93 y 0,85 con pendientes de 0,76 y 0,70, de acuerdo con la subvaloración obtenida con estos métodos para las concentraciones de AGV.

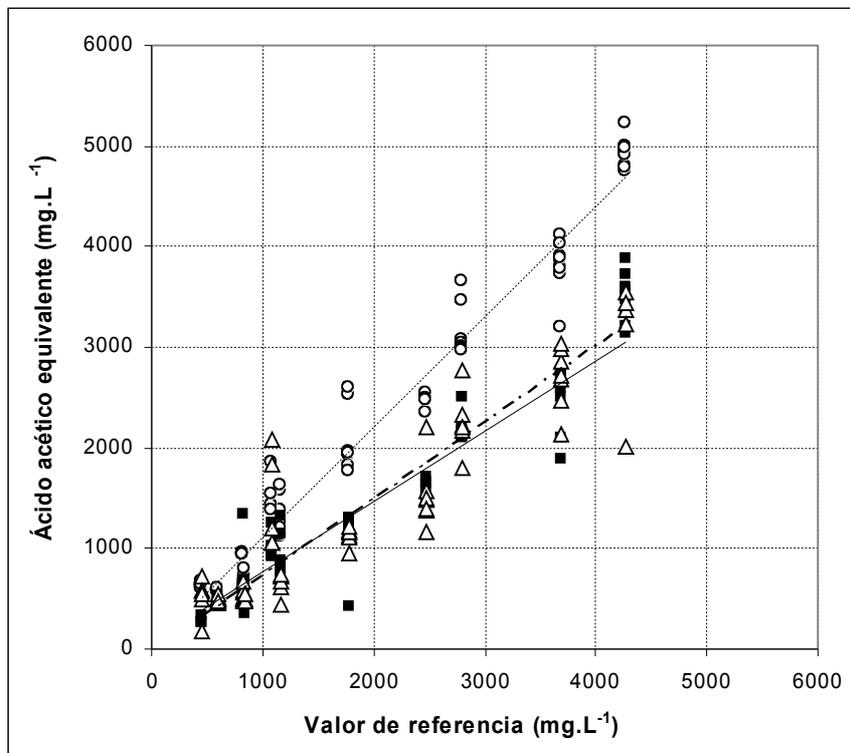


Figura 3.18. Regresión lineal para las concentraciones de AGV estimadas por los métodos INRA (○), Biomath1 (■), Biomath2 (△) frente a las concentraciones de referencia. $AGV(INRA)=1,10 \cdot AGV(Ref)+15$ ($R^2=0,97$); $AGV(Biomath1)=0,76 \cdot AGV(Ref)-21$ ($R^2=0,93$); $AGV(Biomath2)=0,70 \cdot AGV(Ref)+75$ ($R^2=0,85$).

En la Figura 3.19 se pueden observar los resultados del análisis por regresión lineal para las concentraciones de ácido láctico en el rango de 750 a 1500 mg·L⁻¹, calculadas según los métodos Biomath 1 y Biomath 2; ambos métodos presentan coeficientes de determinación muy bajos 0,72 y 0,77, respectivamente. Ambas metodologías sobrestiman la concentración de ácido láctico (pendientes de las rectas de 2,42 y 2,57 respectivamente). Este inconveniente afecta principalmente a las concentraciones mayores a 1000 mg·L⁻¹. Estos resultados indican que las metodologías Biomath 1 y 2 pueden utilizarse para detectar la presencia de ácido láctico a partir de concentraciones mayores de 750 mg·L⁻¹, valor que indicaría un alto grado de acidificación del reactor, por lo que serían poco prácticos.

Los valores estimados por ambas metodologías pueden utilizarse como una primera aproximación de la evolución de las concentraciones del ácido láctico en el

rango de concentraciones de 750 a 1500 mg·L⁻¹. Sin embargo dichos métodos no realizan una estimación fiable de los valores puntuales de las concentraciones de ácido láctico.

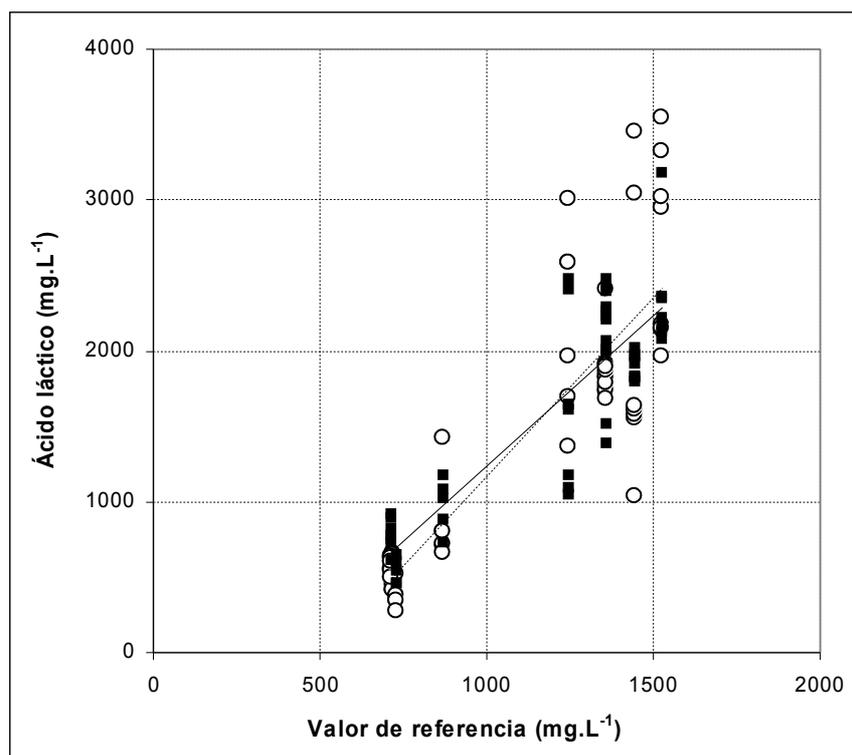


Figura 3.19. Regresión lineal para las concentraciones de ácido láctico estimadas por los métodos Biomath1 (○) y Biomath2 (■) frente a las concentraciones de referencia. $LAC(Biomath1)=2,36 \cdot LAC(Ref)-1190$ ($R^2=0,72$); $LAC(Biomath2)=1,99 \cdot LAC(Ref)-756$ ($R^2=0,77$).

En la figura 3.20 se presentan los resultados del análisis por regresión lineal para las concentraciones estimadas por el método Biomath2 para nitrógeno amoniacal con respecto al valor de referencia. El límite de detección de la metodología Biomath2 para el nitrógeno amoniacal se localizó en este experimento en un valor aproximado de 75 mg·L⁻¹; a partir de valores mayores a 250 mg·L⁻¹ los resultados del método no son adecuados; por tanto el rango de medición para el método Biomath2 se circunscribe a valores de 75 a 250 mg·L⁻¹ de nitrógeno amoniacal.

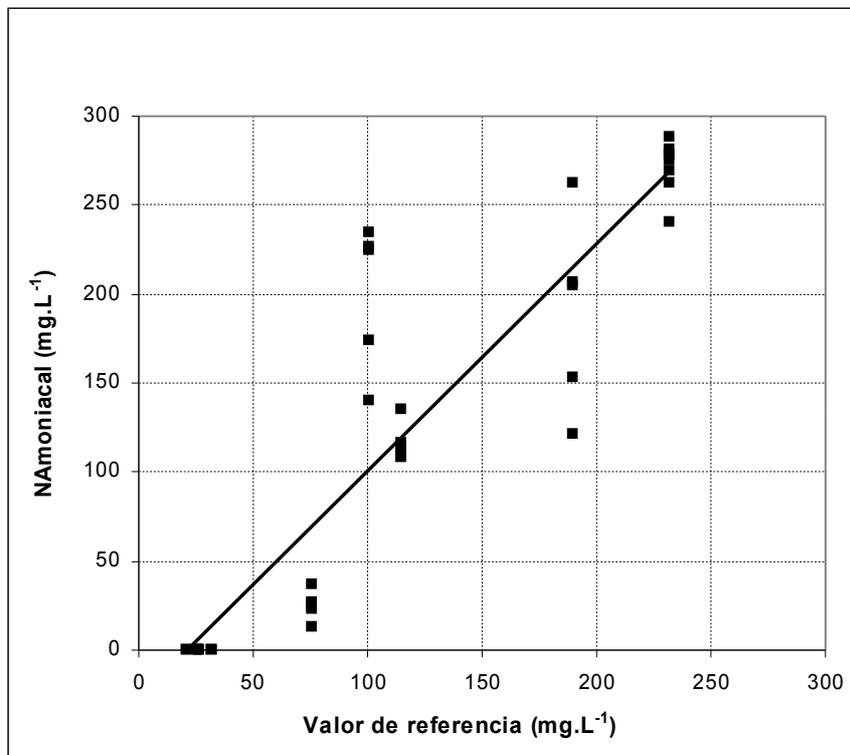


Figura 3.20. Regresión lineal para las concentraciones de Nitrógeno Amoniacal estimadas por el método Biomath2 (■) frente a las concentraciones de referencia.
 $NA_{moniacal}(Biomath2) = 1,27 \cdot NA_{moniacal}(Ref) - 26$ ($R^2 = 0,79$).

El coeficiente de determinación y la pendiente resultantes de la regresión lineal para la estimación de la concentración de nitrógeno amoniacal por el método Biomath2, tienen valores de 0,79 y 1,27, respectivamente; los valores anteriores indican que el método Biomath2 tiene una respuesta adecuada en la estimación de las concentraciones de nitrógeno amoniacal en el rango de 75 a 250 mg·L⁻¹. Este rango es muy limitado si se compara con las concentraciones de varios g·L⁻¹ encontradas normalmente en reactores anaerobios que depuran residuos con alto contenido de nitrógeno orgánico o amoniacal (Karakasehv *et al.*, 2005).

3.4. Conclusiones y recomendaciones

3.4.1. Conclusiones

El analizador ANASENSE® demostró ser un equipo útil, que representa un avance importante en el campo de monitorización *on-line* de alcalinidad y AGV, permitiendo el uso de estos parámetros en el control automático de reactores anaerobios.

El sensor ANASENSE® se validó en Planta Piloto, en operación durante 60 días, utilizando un sistema de filtración tangencial de sólidos mediante el que se controlaron eficazmente los problemas de obstrucción y ensuciamiento. Solo fue necesario recalibrar el electrodo de pH y limpiar el vaso de reacción una vez a la semana.

Respecto a las metodologías estudiadas, INRA y Applitek presentaron en general buena precisión y exactitud para la determinación de AGV (0 a 4900 mg·L⁻¹) y bicarbonato (0 a 50 mg·L⁻¹).

La metodología de Biomath presentó importantes limitaciones debido a la rapidez con que se realizó la valoración de bicarbonato y de AGV, generando información insuficiente para construir las curvas de valoración. Este problema afecta especialmente a la valoración de concentraciones bajas de AGV y bicarbonato. Para resolver esta deficiencia se recomendó ajustar el ANASENSE® para realizar la valoración en forma más lenta, recomendación que se tuvo en cuenta durante la validación industrial del equipo.

El ensuciamiento del electrodo de pH afectó negativamente la respuesta de las metodologías INRA y Applitek, aumentando el error de las estimaciones realizadas por dichas metodologías con el tiempo de ensuciamiento; exceptuando la respuesta adecuada de la metodología INRA en la estimación de las concentraciones de bicarbonato.

El analizador presentó un buen rendimiento en la determinación *on-line* de las relaciones de alcalinidad AI/AT y AI/AP, la relación AI/AP mostró mayor sensibilidad en la detección de sobrecargas orgánicas. De acuerdo con estos resultados el ANASENSE® puede utilizarse en la monitorización *on-line* de las relaciones de alcalinidad con el propósito de realizar control en lazo cerrado del proceso de digestión anaerobia.

El sensor ANASENSE se validó posteriormente en ambiente industrial, en operación continua también durante 60 días. El equipo presentó algunas debilidades en cuanto a robustez. El punto más importante a tener en cuenta es la necesidad de

desarrollar un sistema de eliminación de sólidos y de desgasificación del efluente ya que de esto depende en gran parte la aplicabilidad del sensor.

De las metodologías disponibles, la más sencilla, de mejor precisión y exactitud para la determinación de AGV y bicarbonato fue la metodología INRA.

Por otro lado, las metodologías Biomath 1 y 2 permiten la determinación, aunque con un margen de error muy considerable, de otros compuestos como amonio y ácido láctico, generando resultados cualitativos que permiten estimar tendencias.

Posterior a la validación, la respuesta de la metodología Biomath 1 fue mejorada ostensiblemente al eliminar parcialmente el ruido de la curva de valoración, para lo cual se utilizó en el procesamiento de los datos una ventana móvil de observación de 5 datos y su corrección por medio de una regresión parabólica, suavizando de esta manera el ruido presente en los datos (Ruiz *et al.*, 2005b).

3.4.2. Recomendaciones

El control de sólidos en la muestra es el problema más importante en el funcionamiento del equipo, por lo que se recomienda el uso de una unidad de micro-filtración y la limpieza periódica (mínimo cada 24 horas) del sensor de pH.

El buen funcionamiento de la bomba de drenaje es otro aspecto clave. Se requiere una bomba robusta que asegure la evacuación total del vaso de valoración impidiendo la mezcla de la muestra con restos del análisis anterior. Se recomienda utilizar una bomba peristáltica para esta función.

Debe considerarse cómo purgar automáticamente el aire de la línea de inyección de HCl. Una posibilidad consiste en realizar el drenaje parcial de la microbureta que dosifica el HCl tras cada análisis, desplazando de esta manera las burbujas de aire de la microbureta y del tubo de dosificación de ácido. Adicionalmente el ácido a purgar puede utilizarse en la limpieza automática del vaso de valoración y del electrodo de pH.

3.5. Referencias

- Anderson G.K. and Yang G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research*, 64(1), 53-59.
- AppliTek. (2003). Operation Manual Anasense®, Anaerobic Control Analyzer. AppliTek N.V. Belgium.
- Bernard O., Chachuat B., Hélias A., Le Dantec B., Sialve B., Steyer J.-P., Lardon L., Neveu P., Lambert S., Ratini P., Frattesi S., Lema J., Roca E., Ruiz G., Rodriguez J., Franco A., Vanrolleghem P., Zaher U., De Pauw D.J.W., De Neve K., Lievens K., Dochain D., Schoefs O., Fibrianto H., Farina R., Alcaraz Gonzalez V., Gonzalez Alvarez V., Lemaire P., Martinez J.A., Duclaud O. and Lavigne J.F. (2005). TELEMAC: an integrated system to remote monitor and control anaerobic wastewater treatment plants through the internet. *Water Science and Technology*, 52(1/2), 457-464.
- Björnsson L., Murto M., Jantsch T. and Mattiasson B. (2001). Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion. *Water Research*, 35(12), 2833-2840.
- Bouvier J., Steyer J.P. and Delgenes J.P. (2002). On line titrimetric sensor for the control of VFA and/or alkalinity in anaerobic digestion processes treating industrial vinasses. In: *Proceedings VII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion*, Merida, Mexico, October 23-25, 65-68.
- Buchauer K. (1998). A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge treatment processes. *Water SA*, 24(1), 49-56.
- De Neve K. and Lievens K. (2004). On-line analyser solves monitoring problem in biogas digester. *Water and Wastewater international*, 19(6), 28.
- Feitkenhauer H., von Sachs J. and Meyer U. (2001). On-line titration of volatile fatty acids for the process control of anaerobic digestion plants. *Water Research*, 36, 212-218.
- García C., Molina F., Roca E. and Lema J.M. (2007). Fuzzy-based control of an anaerobic reactor treating wastewaters containing ethanol and carbohydrates. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(21), 6707-6715.
- Hawkes F.R., Guwy A.J., Hawkes D.L. and Rozzi A.G. (1994). On-line monitoring of anaerobic digestion: application of a device for continuous measurement of bicarbonate alkalinity. *Water Science and Technology*, 30(12), 1-10.
- Jenkins S.R., Morgan, J.M. and Sawyer, C.L. (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Journal WPCF*, 55(5), 448-453.
- Kanokwan B., Batstone D. and Angelidaki I. (2007). An innovative online VFA monitoring system for the anaerobic process, based on headspace gas chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(4), 712-721.

- Karakashev D., Batstone D.J. and Angelidaki I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic composition in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 331-338.
- Kapp H. (1992). On line messung der organischen sauren. *Korrespondenz Abwasser*, 39(7), 999-1004.
- Lahav O. and Loewenthal R.E. (2000). Measurement of VFA in anaerobic digestion: The five-point titration method revisited. *Water SA*, 26(3), 389-392.
- Lahav O., Shlafman E., Morgan B.E., Loewenthal R.E. and Tarre S. (2002a). Accurate on-site volatile fatty acids (VFA) measurement in anaerobic digestion-verification of a new titrative method. In: *Proceedings VII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion*, October 23-25, Merida, Mexico, 65-68.
- Lahav O., Morgan B.E. and Loewenthal R.E. (2002b). Rapid, simple and accurate method for measurement of VFA and carbonate alkalinity in anaerobic reactors. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 2736-2741.
- Lahav O. and Morgan B.E. (2004). Titration methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries-a review. *Journal Chem. Technol. Biotechnol.*, 79, 1331-1341.
- McCarty P. L. (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals. Part two. Environmental requirements and control. *Public Works*, 95, 123-126.
- McGhee J. (1968). A method for approximation of volatile acid concentrations in anaerobic digesters. *Water and Sewage Works*, 115, 162-166.
- Moosbrugger R.E., Wentzel M.C., Ekama G.A. and Marais G.V. (1992). Simple titration procedures to determine H₂CO₃* alkalinity and short-chain fatty acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acid/bases. WRC Report No TT 57/92. Pretoria, South Africa.
- Pind P.F., Angelidaki I. and Ahring B.K. (2002). A novel in-situ sampling and VFA sensor technique for anaerobic systems. *Water Science and Technology*, 45(10), 261-268.
- Puñal A., Melloni P., Roca E., Rozzi A. and Lema JM. (2001). Automatic start-up of UASB reactors. *Journal of Environmental Engineering*, may, 397-402.
- Ripley L., Boyle W. and Converse J. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, 58(5), 406-411.
- Rozzi A., Massone A. and Antonelli M. (1997). A VFA measuring biosensor based on nitrate reduction. *Water Science and Technology*, 36(6-7), 183-189.
- Ruiz G. (2005a). Monitorización y control avanzado de reactores anaerobios, Tesis Doctoral. Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Ruiz G., Molina F., Steyer J.P., Vanrolleghem P., Zaher U., Roca E. and Lema J.M. (2005b). Industrial scale validation of a new titrimetric sensor for anaerobic digestion processes: comparison of methodologies. In: *Proceedings 2nd Conference on Instrumentation, Control and Automation in Water and Wastewater Treatment*, May 29-June 2, Busan, South Korea, 133-141.

Validación de un sistema automático de monitorización de alcalinidad y ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios

- Spanjers H., Bouvier J.C., Steenweg P., Bisschops I., van Gils W. and Versprille B. (2006). Implementation of in-line infrared monitor in full-scale anaerobic digestion process. *Water Science and Technology*, 53(4-5), 55-61.
- Steyer J.P., Bouvier J.C., Conte T., Gras P., Harmand J. and Delgenes J.P. (2002a). On-line measurements of COD, TOC, VFA, total and partial alkalinity in anaerobic digestion processes using infra-red spectrometry. *Water Science and Technology*, 45(10), 133-138.
- Steyer J.P., Bouvier J.C., Conte T., Gras P., and Sousbie P. (2002b). Evaluation of a four year experience with a fully instrumented anaerobic digestion process. *Water Science and Technology*, 45(4-5), 495-502.
- Steyer J.P., Bernard O., Batstone D.J., and Angelidaki I. (2006). Lessons learnt from 15 years of ICA in anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 53(4-5), 25-33.
- Switzenbaum M.S., Giraldo-Gómez E. and Hickey R.F. (1990). Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. *Enzyme Microbiology and Technology*, 12(10), 722-730.
- TELEMAC European Project (2003). TELEMonitoring and Avanced teleControl of high yield wastewater treatment. Deliverable D 2.4. Development of two on-line analysers for the control of the anaerobic digestion process.
- Van de Steene M., Van Vooren L., Ottoy J.P. and Vanrolleghem P.A. (2002). Automatic buffer capacity model building for advanced interpretation of titration curves. *Environmental Science and Technology*, 36(4), 715-723.
- Vanrolleghem P.A. and Lee D.S. (2003). On-line monitoring equipment for wastewater treatment processes: state of the art. *Water Science and Technology*, 47(2), 1-34.
- Van Vooren L., Willems P., Ottoy J.P., Vansteenkiste G.C. and Verstraete W. (1996). Automatic buffer capacity based sensor for effluent quality monitoring. *Water Science and Technology*, 33(1), 81-387.
- Van Vooren L. (2000). Buffer capacity based multipurpose hard- and software sensor for environmental applications, PhD. Thesis. University of Ghent. Ghent, Belgium.
- Van Vooren L., Van de Steene M., Ottoy J.P. and Vanrolleghem P. (2001). Automatic buffer capacity model building for the purpose of water quality monitoring. *Water Science and Technology*, 43(7), 105-113.
- Zaher U. and Vanrolleghem P. (2005). Automatic initialisation of buffer composition estimation for on-line analysis of unknown buffer solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383(4), 605-618.

Capítulo 4

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones.

Resumen

En este capítulo se realiza el análisis dinámico del comportamiento de un digestor anaerobio USBF escala piloto, estudiando su respuesta ante diferentes perturbaciones (pulso-escalón) en la Velocidad de Carga Orgánica alimentada y frente a un choque térmico. Se realiza el análisis de un conjunto de variables de estado para identificar desestabilizaciones del sistema. Se lleva a cabo la selección del número mínimo de variables que permiten clasificar adecuadamente diferentes estados estacionarios así como la selección de variables para la identificación de perturbaciones. Finalmente se comparan y discuten los resultados obtenidos por ambas aproximaciones.

Los estudios se ejecutaron en la planta piloto anaerobia descrita en el capítulo 2, utilizando las aguas residuales tipo hidratos de carbono y proteína hidrolizada. Los experimentos en dinámico se desarrollaron por la técnica de estímulo-respuesta, aplicando perturbaciones tipo impulso y escalón de concentración de sustrato y reducción de temperatura del sistema.

La selección de variables en estado estacionario se realizó utilizando en primer lugar la técnica de Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis PCA) para reducir el número de variables; posteriormente se clasificaron los datos en estado estacionario utilizando la técnica de regresión lineal sobre una ventana móvil y por último utilizando la técnica de Análisis Factorial Discriminante (Factorial Discriminant Analysis FDA) se seleccionó el número mínimo de variables que permiten clasificar adecuadamente los diferentes estados estacionarios alcanzados en la experimentación.

Estudiando el comportamiento dinámico del sistema se evaluó la respuesta de las variables indicadoras ante las diferentes perturbaciones generadas. Se emplearon parámetros empíricos como: tiempo hasta el valor máximo, tiempo hasta pendiente máxima, nivel de excitación y pendiente normalizada de la respuesta. Se identificó la pendiente normalizada como el parámetro clave en la detección de perturbaciones en la Velocidad de Carga Orgánica (VCO), debido a que dicho parámetro representa la velocidad de respuesta del sistema frente a cambios en las características del residuo o cambios en las condiciones de operación del sistema.

Índice

4.1. Introducción

- 4.1.1. Detección de estados estacionarios
- 4.1.2. Selección del número mínimo de variables para clasificar estados estacionarios
- 4.1.3. Selección de variables en estados dinámicos

4.2. Materiales y métodos

- 4.2.1. Unidad experimental y aguas residuales tipo
- 4.2.2. Protocolo de experimentación
- 4.2.3. Variables estudiadas
- 4.2.4. Metodología de determinación del número mínimo de variables para clasificar estados estacionarios
- 4.2.5. Metodología de selección de variables para la identificación de perturbaciones

4.3. Resultados y discusión

- 4.3.1. Selección de variables en estados estacionarios
- 4.3.2. Determinación del número mínimo de variables para la identificación de diferentes estados estacionarios
- 4.3.3. Selección de variables en estados dinámicos
- 4.3.4. Análisis conjunto

4.4. Conclusiones

4.5. Referencias

4.1. Introducción

La operación en condiciones de estabilidad es uno de los objetivos fundamentales en los procesos de depuración biológica de aguas residuales (Olsson *et al.*, 2005). Esta condición es básica en el proceso de digestión anaerobia, donde participan un complejo e interdependiente conjunto de microorganismos. Las perturbaciones del proceso generalmente se originan por cambios en la calidad del agua residual a depurar o por variaciones en la operación del sistema. Los cambios más comunes en la calidad del residuo son: aumento de la concentración de materia orgánica (DQO), cambio en la naturaleza del agua residual, variación del pH, déficit de alcalinidad, déficit de nutrientes y vertido de alguna sustancia inhibidora o tóxica (Speece, 1996; Mathiot *et al.*, 1992). Las variaciones en la operación del sistema pueden estar relacionadas con fluctuaciones de la temperatura de operación, cambios en las condiciones hidráulicas y lavado excesivo de biomasa (Mathiot *et al.*, 1992).

La operación estable del proceso de digestión anaerobia garantiza la conversión a metano de la materia orgánica y la baja o nula acumulación de productos intermedios como son los ácidos grasos volátiles (AGV). La secuencia de acumulación de AGVs se inicia con la acumulación de ácido acético y posteriormente aparecen los ácidos propiónico y butírico (Pullammanappallil *et al.*, 2001), el pH del sistema desciende y el reactor puede acidificarse generándose inhibición y en casos extremos la muerte de la biomasa metanogénica (Pullammanappallil *et al.*, 2001; Tay and Zhang, 2000; Speece, 1996).

Por estas razones, la diagnosis temprana de perturbaciones es fundamental en el control y operación de reactores biológicos anaerobios (Moletta, 1989; Switzenbaum *et al.*, 1990; Mathiot *et al.*, 1992). La detección temprana de las perturbaciones permite desarrollar rápidamente las acciones concretas más eficaces para reconducir el proceso a condiciones estables.

Con la introducción de los reactores anaerobios de alta carga en los años 80 se hizo necesario avanzar en la investigación de indicadores que permitan detectar en forma temprana las perturbaciones en el proceso. Numerosos estudios se han realizado en reactores a escala de laboratorio, planta piloto y escala industrial; utilizando diferentes aguas residuales y evaluando diferentes indicadores.

En este capítulo se sistematiza el estudio de indicadores para dos aguas residuales tipo en planta piloto; comparando los mejores indicadores para clasificar los diferentes estados estacionarios con los indicadores que alertan en forma temprana la ocurrencia de una perturbación. El estudio pretende compatibilizar ambos grupos de indicadores.

En estado estacionario se estudiaron las variables que mejor identifican los diferentes estados estacionarios desarrollados en la experimentación. Para lo cual se utilizaron las herramientas de análisis de componentes principales (PCA) y análisis factorial discriminante (FDA); realizando las siguientes operaciones: reducción del número de variables, selección de los datos en estado estacionario y por último clasificación en los diferentes estados estacionarios utilizando todas las variables, cada variable por separado y combinaciones de las variables. En la segunda parte del trabajo se evaluó la respuesta de las variables en dinámico ante perturbaciones en la VCO en forma de pulso y escalón. En la clasificación de las diferentes variables se utilizaron como parámetros los tiempos de retardo y la velocidad de respuesta. Finalmente se realiza el análisis y la comparación de los resultados obtenidos mediante estos dos enfoques.

4.1.1. Detección de estados estacionarios

La detección rigurosa de estados estacionarios es fundamental en la determinación de parámetros de operación, optimización, simulación y control de procesos químicos y biológicos (Brown and Rhinehart, 2000). Por tanto, los datos empleados en la construcción de modelos de operación, optimización, simulación y control deben adquirirse en condiciones de estado estacionario, de lo contrario los modelos serán construidos sobre parámetros erróneos y sus resultados serán deficientes (Jiang *et al.*, 2003).

Tradicionalmente en procesos químicos o bioquímicos un experto analiza los datos y decide si el proceso se encuentra o no en estado estacionario. Sin embargo, los expertos pueden equivocarse o no realizar un análisis objetivo de la información disponible; esto puede ocurrir debido a diferentes razones: presencia de nivel de ruido importante en las señales de los sensores y dinámica lenta del proceso que no permite identificar claramente los cambios (Szela and Rhinehart, 2002); procesos multivariantes en los cuales se hace difícil interpretar los datos debido a la existencia de correlación entre las variables y la dificultad de separar los efectos independientes de cada una de ellas (Olsson and Nielsen, 2001); existencia de diferentes estados estacionarios dependiendo de las condiciones del proceso y por último en procesos biológicos la adaptación dinámica de la biomasa al sustrato puede generar diferentes estados estacionarios para las mismas condiciones de operación.

La metodología más simple para decidir si un conjunto de datos pertenece a un estado estacionario es realizar una regresión lineal sobre una ventana móvil de los datos; contrastando el valor de la pendiente de dicha regresión con una prueba del estadístico t. Si la pendiente es significativamente diferente de cero, los datos no pertenecen a un estado estacionario. Esta metodología presenta algunos

inconvenientes para su aplicación *on-line*, como son gran almacenamiento de datos y la necesidad de seleccionar adecuadamente la ventana (Brown and Rhinehart, 2000).

Se han desarrollado diferentes metodologías de detección *on-line* de estados estacionarios. Crow *et al.* (1955) propusieron una metodología basada en un test-F que compara la varianza de un grupo de datos con respecto a la media y a la varianza secuencial de los mismos datos. Posteriormente la metodología propuesta por estos investigadores fue mejorada reemplazando la media de los datos por un filtro exponencial que utiliza el valor actual y el valor filtrado anterior (Cao and Rhinehart, 1995, 1997; Brown and Rhinehart, 2000) evitando de esta manera el almacenamiento de gran cantidad de datos. Esta metodología fue posteriormente aplicada a procesos de digestión anaerobia en la selección de variables para la identificación de estados del proceso (Ruiz *et al.*, 2004a; Ruiz, 2005a).

En el presente trabajo, debido a que el interés se centra en clasificar los datos pertenecientes a estados estacionarios y luego identificar las mejores variables para su clasificación, se utilizó la metodología *off-line* de regresión lineal sobre una ventana móvil. Para facilitar la aplicación de esta metodología se realizó la reducción de la dimensión del problema (número de variables) utilizando la técnica de análisis de componentes principales (PCA). Posteriormente se procedió a clasificar los datos en estado estacionario utilizando la prueba del estadístico t sobre la pendiente de la regresión lineal en una ventana para cada una de las dos primeras componentes principales calculadas por el PCA. Si dichas regresiones presentan una pendiente que no es significativamente diferente a cero, entonces se acepta que el dato pertenece a un estado estacionario. Una breve introducción de las técnicas de PCA y prueba del estadístico t de la pendiente de regresión lineal se presentan a continuación.

Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica de reducción de la dimensionalidad de un proceso multivariante. Si existe la posibilidad de describir con precisión p variables utilizando un subconjunto de ellas tal que $r < p$, se habrá reducido la dimensión del proceso a costa de una pequeña pérdida de información. Por ejemplo en variables con alta dependencia es frecuente que un pequeño número de las nuevas variables (menos del 20% de las originales) expliquen la mayor parte de la variabilidad original (sobre el 80%) (Peña, 2002). La técnica de análisis de componentes principales fue desarrollada por Hotteling en 1933 basándose en los trabajos realizados por Pearson en 1901. Dicha técnica se fundamenta en la construcción de nuevas variables (componentes principales) a partir de la combinación lineal de las variables originales de modo que las nuevas variables contengan la mayor información posible en términos de variabilidad.

De esta manera, el vector de la primera componente se orienta en la dirección de la mayor variabilidad de los datos, la segunda componente se ubica en el hiperplano ortogonal a la primera componente en la dirección de mayor variabilidad de los datos y así sucesivamente hasta obtener tantas componentes principales como variables tiene el proceso (Peña, 2002). La Figura 4.1 muestra la representación geométrica del análisis de componentes principales para la dimensión 3; en la cual P1 y P2 son las dos primeras componentes principales y definen un nuevo plano que recoge la mayor variabilidad de los datos.

Además de reducir la dimensión del proceso, el análisis de componentes principales agrupa las variables que presentan interdependencia lineal. Cuando se realizan mediciones de muchas variables en un proceso multivariante, existen variables que dependen de otras; consecuentemente la verdadera dimensión del proceso es usualmente mucho menor que el número de variables medidas (Olsson and Nielsen, 2001). En el análisis y manejo de datos de estaciones depuradoras de aguas residuales se utiliza la técnica de PCA para clasificar los estados del proceso. Graficando la primera componente contra la segunda, se obtiene una visión rápida y transparente de los datos que permite visualizar la dinámica del proceso. Los datos que forman grupos representan estados similares y los datos no agrupados indican transiciones o cambios (Rosen and Olsson, 1998; Olsson *et al.*, 2005).

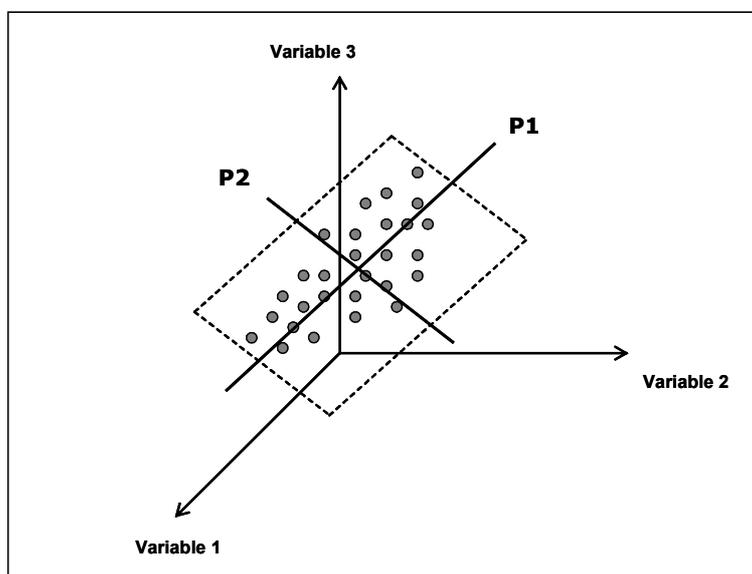


Figura 4.1. Representación geométrica del análisis de componentes principales.

La monitorización automática de procesos genera la adquisición de una cantidad apreciable de datos en pocas horas, para aplicar el PCA dichos datos se organizan en una matriz X de dimensión $m \cdot n$, consistente en m observaciones de n variables. Inicialmente los datos de la matriz X se estandarizan sustrayendo la media y dividiendo por la varianza.

El cálculo de las componentes principales utilizando álgebra lineal consiste en la descomposición en valores singulares (SVD) asociados a la matriz de varianzas-covarianzas (Σ) correspondiente a la matriz X . Por tanto, la aplicación del análisis de componentes principales a una matriz de datos $X_{(m \cdot n)}$ se inicia determinando la matriz de varianzas covarianzas $\Sigma_{(n \cdot n)}$; luego se determinan los autovectores y autovalores de la matriz de varianzas-covarianzas obteniendo las matrices $P_{(n \cdot n)}$ y $A_{(n \cdot n)}$ que son respectivamente la matriz de autovectores y la matriz de autovalores asociada.

Los valores de las componentes principales se obtienen multiplicando la matriz de datos $X_{(m \cdot n)}$ por la matriz $P_{(n \cdot n)}$, generando la matriz $T_{(m \cdot n)}$ que es una combinación lineal de los datos originales contenidos en X con los coeficientes definidos por la matriz P . De otro lado, la matriz $A_{(n \cdot n)}$ contiene la varianza retenida por cada componente principal, generalmente las 2 ó 3 primeras componentes principales retienen la mayoría de la varianza de los datos. De esta manera se reduce un problema de dimensión n a dimensión 2 ó 3. El algoritmo para la ejecución del PCA se encuentra implementado en software comercial como por ejemplo Matlab™ o SPSS™.

Prueba del estadístico t de la pendiente de la regresión lineal

Tal como se mencionó en el capítulo 3 (apartado 3.2), el problema de la regresión lineal consiste en definir la recta que mejor ajuste los datos; generalmente se utiliza el método de mínimos cuadrados que elige la recta de regresión que minimiza las distancias cuadráticas verticales entre los datos y la recta; para lo cual se calculan los valores de a y b de manera que se minimice la siguiente función:

$$\text{Min}_{a, b \in \mathbb{R}} \sum_{i=1}^n (Y_i - a - bX_i)^2 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Donde:

Y : variable dependiente

X : variable independiente

Resolviendo por cálculo diferencial se obtienen los estimadores mínimo cuadráticos de los coeficientes de la recta de regresión tal como se presentan en las ecuaciones 4.2 y 4.3.

$$\hat{b} = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

$$\hat{a} = \bar{Y} - \hat{b}\bar{X} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

Donde:

\bar{Y} : media muestral de la variable Y

\bar{X} : media muestral de la variable X

S_{xy} : covarianza muestral de las variables X y Y

S_{xx} : varianza muestral de la variable X

Como ocurre con todos los estimadores existirá cierta incertidumbre en el cálculo de las estimaciones que se podrá reflejar mediante intervalos de confianza para a y b , contruidos bajo la hipótesis de normalidad de los residuos. En el presente caso interesa específicamente hacer el contraste de hipótesis $H_0: b=0$ frente a $H_0: b \neq 0$. Para ello se construye el intervalo de confianza para la pendiente de la recta de regresión b utilizando la ecuación 4.4. Si el cero se localiza dentro de dicho intervalo se podrá admitir con una confianza por ejemplo del 90% ($\alpha = 0,1$) la hipótesis nula de que la pendiente de la recta es igual a cero y que, por tanto, el dato pertenece a un estado estacionario.

$$IC(1 - \alpha)\%(b) = \hat{b} \pm t_{n-2}^{\alpha/2} \frac{S_{res}}{\sqrt{S_{xx}}} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

Siendo:

S_{res} : cuasivarianza muestral de los residuos

$t_{n-2}^{\alpha/2}$: valor de la t-Student para una probabilidad $\alpha/2$ con $n-2$ grados de libertad

4.1.2. Selección del número mínimo de variables para clasificar estados estacionarios

Una vez clasificados los datos en estados estacionarios el siguiente paso es identificar el número mínimo de variables que permiten discriminar en forma adecuada los diferentes estados estacionarios (Ruiz, 2005a; Castellano *et al.*, 2007). La búsqueda de este conjunto o conjuntos de variables tiene como objetivo identificar cuales son las variables o combinaciones de variables que explican adecuadamente los diferentes estados estacionarios. Cuando no es posible contar a

priori con un conjunto de datos bien clasificados en los diferentes estados estacionarios, lo más apropiado es utilizar métodos *Cluster* para agrupar los datos (Castellano *et al.*, 2007).

Utilizando la técnica de FDA, previa selección de datos en estados estacionarios, Ruiz (2005a) y Castellano *et al.* (2007) trabajando en planta piloto y utilizando agua residual sintética emulando el residuo de la fabricación de vino (vino blanco diluido), identificaron 2 indicadores y 137 combinaciones de dos indicadores que discriminaban al 100 % los diferentes estados estacionarios estudiados. Los dos indicadores identificados por estos investigadores y que por si solos permitían una clasificación unívoca de todos los estados estacionarios identificados, pertenecen a la fase gas y son concentración de H₂ y caudal de biogás (Qbiogás). A partir de las 137 combinaciones de parejas de indicadores, utilizando criterios de velocidad de respuesta y coste de monitorización, se seleccionó la combinación: concentración de H₂ y QBiogás; como la más adecuada para identificar el estado del proceso, para la problemática planteada con esta agua residual.

Utilizando los datos clasificados en estado estacionario y mediante la técnica de análisis factorial discriminante (FDA) se identifican las variables y conjuntos de variables que discriminan adecuadamente los estados estacionarios. Inicialmente se evaluó la máxima capacidad de clasificación utilizando todas las variables y luego se estudió el poder de clasificación de cada variable en forma independiente y de las combinaciones por parejas de variables. A continuación se presenta una breve introducción a la técnica de FDA.

Análisis Factorial Discriminante (FDA)

El análisis factorial discriminante (FDA) es una técnica estadística que permite seleccionar las combinaciones lineales de las variables originales que mejor separan o discriminan varios grupos en una población, mediante una clasificación conocida *a priori* (Peña, 2002). El análisis factorial discriminante clásico se debe a Fisher (científico inglés, 1890-1862). El FDA opera de forma similar al PCA, no se presupone ningún modelo que relacione las variables, simplemente se realizan las proyecciones de las variables sobre un nuevo eje de coordenadas de manera que se separen lo más posible los grupos de datos. La clasificación *a priori* de los datos en grupos permite clasificar futuras observaciones.

Los datos clasificados en *g* grupos se almacenan en la matriz de datos *X*, cada grupo se encuentra almacenado en un vector *Y*. La técnica de análisis factorial discriminante busca los factores (combinación lineal de las variables originales) sobre los que se obtiene la mejor proyección de los datos (sobre el espacio multivariante) de manera que los datos se agrupen de de la forma más similar

posible a los g grupos originales. Estos factores constituyen una base ortogonal del espacio multivariante generando hiperplanos ortogonales (Peña, 2002).

La selección de estos factores se realiza minimizando la probabilidad de clasificación incorrecta. El procedimiento matemático utilizado construye los factores discriminantes de manera que se minimice la distancia de Mahalanobis entre los datos de un mismo grupo y se maximice la distancia entre los diferentes grupos. De esta manera se logra obtener grupos compactos, y que estén separados lo más posible entre ellos. Al graficarse los datos tomando como ejes los dos primeros factores discriminantes se genera un mapa territorial que permite identificar visualmente los diferentes grupos y clasificar rápidamente las nuevas observaciones. El algoritmo para la ejecución del FDA también se encuentra implementado en software comercial como Matlab™ o SPSS™.

4.1.3. Análisis dinámico de digestores anaerobios

El análisis dinámico de reactores anaerobios pretende mejorar el conocimiento del comportamiento del proceso frente a la variable temporal, como respuesta a perturbaciones que usualmente están relacionadas con la alta variabilidad de la concentración y del caudal del agua residual a depurar. Las características típicas del agua residual (caudal y concentración) en un sistema de depuración de aguas residuales municipales puede variar en factores de 2 a 10 en cortos períodos de tiempo (Olsson and Nielsen, 2001).

Dicha variabilidad se acentúa en las aguas residuales industriales y aumenta el riesgo de fallo del proceso cuando se utilizan reactores anaerobios de alta carga, debido a que el tiempo de retención hidráulico es bajo en dichos sistemas y los cambios ocurren rápidamente (Mathiot *et al.*, 1992; Moletta *et al.*, 1994; Cord-Ruwisch *et al.*, 1997; Zaher and Vanrolleghem, 2005).

El comportamiento dinámico de los reactores anaerobios se ha estudiado evaluando la respuesta de las diferentes variables monitorizadas ante perturbaciones en la calidad o cantidad del agua residual a tratar (sobrecargas orgánicas e hidráulicas) o cambios en las condiciones de operación del sistema (por ejemplo variaciones en la temperatura de operación). Una estrategia muy utilizada en este tipo de estudios es la generación artificial de sobrecargas orgánicas cortas tipo pulso o de cambios en la velocidad de carga orgánica en forma sostenida utilizando estímulos tipo escalón. A continuación se realiza una revisión de la bibliografía referente a evaluación del comportamiento dinámico de reactores anaerobios.

En el estudio del comportamiento dinámico de reactores anaerobios, tradicionalmente se ha dividido el grupo de variables con mayor velocidad de

respuesta ante perturbaciones, en variables de fase gas y en variables de fase líquida; en estos dos grupos de variables se centra el presente capítulo. Las variables relacionadas con la fase sólida (biomasa), generalmente presentan una respuesta más lenta frente a perturbaciones y mayores dificultades en su medición tanto *on-line* como *off-line* (Switzenbaum *et al.*, 1990); aunque también presenta gran interés su análisis dinámico. En esta dirección, el capítulo 5 de este trabajo, se centra en el estudio de los cambios en la ecología microbiana y las características técnicas de la biomasa granular sometida a diferentes aguas residuales.

Fase líquida

En diversos estudios se ha investigado, mediante la monitorización de la fase líquida, la respuesta a sobrecargas orgánicas tipo pulso de indicadores del estado del proceso como: pH, alcalinidades (parcial y total) y ácidos grasos volátiles (AGV) (Moletta *et al.*, 1994; Ahring *et al.*, 1995). Adicionalmente hay otros trabajos de investigación en los que se monitorizan gases disueltos en la fase líquida como hidrógeno y metano (Kuroda *et al.*, 1991; Pauss and Guiot, 1993; Björnsson *et al.*, 2001).

Algunos investigadores se inclinan por utilizar las variables de la fase líquida como los mejores indicadores teniendo en cuenta que la fase líquida refleja el ambiente microbiológico donde ocurren las principales reacciones en digestión anaerobia (Björnsson *et al.*, 2001) y debido a que existen limitaciones en la transferencia líquido-gas de productos gaseosos de la digestión anaerobia como el hidrógeno y el metano (Pauss *et al.*, 1990; Kuroda *et al.*, 1991; Pauss and Guiot, 1993; Björnsson *et al.*, 2001). Estas limitaciones en la transferencia líquido-gas generan condiciones de sobresaturación de las concentraciones de hidrógeno en la fase líquida y, por tanto, no es posible utilizar la concentración de hidrógeno en fase gas para estimar por condiciones de equilibrio la concentración en la fase líquida. Sin embargo los sensores desarrollados para monitorizar gases disueltos en la fase líquida presentan problemas de ensuciamiento lo cual dificulta su aplicación a escala comercial (Björnsson *et al.*, 2000).

Existe acuerdo entre los investigadores en afirmar que el pH no es un buen indicador del estado del proceso de digestión anaerobia, debido a su fuerte dependencia con la capacidad tampón o la alcalinidad presente en el sistema (Ahring *et al.*, 1995; Björnsson *et al.*, 2000). Cuando el pH disminuye significa que la capacidad tampón esta disminuyendo debido a la acumulación de AGV. Por tanto, resulta más adecuado utilizar la concentración de AGV en la fase líquida como indicador del desacoplamiento entre microorganismos productores y consumidores de AGV (Switzenbaum *et al.*, 1990). Sin embargo, la utilización de un valor de pH límite (por ejemplo 6,8) ha resultado exitoso en la operación de digestores de lodos (Björnsson *et al.*, 2000).

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

Varios autores han estudiado y propuesto el uso de la alcalinidad o de las relaciones entre alcalinidades (AI/AT y AI/AP) para detectar perturbaciones (McCarty, 1964; Ripley *et al.*, 1986; Anderson and Yang, 1992; Hawkes *et al.*, 1994; Puñal *et al.*, 2001; Steyer *et al.*, 2006).

Whitmore *et al.* (1985, 1986, 1987), evaluaron el efecto de pulsos de diferentes AGV y glucosa en reactores anaerobios completamente mezclados en rango mesofílico y termofílico; realizando mediciones por espectrometría de las concentraciones de hidrógeno y metano disueltos en la fase líquida. Al realizar las perturbaciones en la VCO en forma de pulsos; encontraron una clara asociación entre el aumento de la concentración de AGV y la concentración de hidrógeno disuelto. En el rango mesofílico; los valores máximos de las concentraciones de hidrógeno y metano disueltos, se presentan en tiempos cortos de 6 a 60 minutos después de realizado el pulso. Por su parte los AGV presentan tiempos de respuesta mayores, del orden de varias horas.

Kuroda *et al.* (1991) detectaron concentraciones de hidrógeno en la fase líquida que superaban ampliamente (60 veces) las concentraciones calculadas a partir del equilibrio con la presión parcial del H₂ en la fase gas. Adicionalmente al utilizar glucosa como sustrato, encontraron que la concentración de hidrógeno disuelto aumenta considerablemente inhibiendo la degradación de AGV; generando la inhibición de la metanogénesis, el descenso del pH y el fallo del proceso. Por lo tanto consideran que el mejor indicador de sobrecarga orgánica es la concentración de hidrógeno disuelto en fase líquida; sin embargo el sensor utilizado presentó problemas de interferencia con sulfuros.

Pauss and Guiot (1993), determinaron la concentración de hidrógeno disuelto en la fase líquida para varias velocidades ascensionales y cargas orgánicas volumétricas; la concentración del hidrógeno disuelto esta correlacionada con el incremento en la carga orgánica y es independiente del régimen hidráulico. Encontraron una tasa de transferencia líquido-gas muy baja (K_{La}) y valores más altos para la relación hidrógeno disuelto en la fase líquida / presión parcial de hidrógeno en el biogás que los predichos en equilibrio. Concluyen que no es posible predecir la concentración de hidrógeno disuelto en la fase líquida a partir de la presión parcial de hidrógeno en el biogás.

Hawkes *et al.* (1994), encontraron ante una sobrecarga orgánica tiempos de respuesta similares (entre 30 y 50 minutos) en las variables de la fase gas (concentración de H₂ y CO₂) y la alcalinidad bicarbonática. Consideran dichos autores que la medición de la alcalinidad bicarbonática es un parámetro adecuado para identificar sobrecargas orgánicas.

Ahring *et al.* (1995), trabajando con un reactor termofílico completamente mezclado, estudiaron la concentración de diferentes AGV como indicadores de inestabilidades del proceso ocasionadas por sobrecargas hidráulicas, sobrecargas orgánicas y cambios en la temperatura del reactor. Estos investigadores justifican el uso de los AGV como indicador del proceso, debido a que la acumulación de AGV es la respuesta del sistema al desacoplamiento entre la producción y consumo de AGV. Concluyen que la monitorización de las concentraciones de butirato e isobutirato son especialmente útiles como indicadores para diagnosticar las inestabilidades del proceso, debido a que dichos AGV presentan los mayores incrementos (800%) en tiempos menores a un día como respuesta a las perturbaciones.

Cord-Ruwisch *et al.* (1997); utilizaron la concentración de hidrógeno disuelto como indicador temprano de fallo y como parámetro de control en un reactor anaerobio mesofílico. Encontraron una relación *quasi-lineal* entre la carga orgánica y la concentración de hidrógeno disuelto en la fase líquida.

Diferentes pulsos de glucosa, proteína y lípidos fueron estudiados por Björnsson *et al.* (2001) en un digestor de lodos a escala de laboratorio. Los pulsos de glucosa generaron las concentraciones de hidrógeno disuelto más altas frente a cargas orgánicas similares con los otros sustratos. Con glucosa el tiempo a los valores máximos tanto para hidrógeno disuelto como para AGV fueron de 2,5 horas. Los autores consideran que el hidrógeno disuelto es un buen indicador del desacople entre los grupos de microorganismos que realizan el proceso de digestión anaerobia. Sin embargo el principal problema del sensor de H₂ disuelto frente a posibles aplicaciones industriales es su ensuciamiento lo que obliga a cambios periódicos (cada 48 horas) de la membrana que lo protege.

Fase gas

Los indicadores de la fase gas son más atractivos desde el punto de vista de facilidad de medida y adquisición en tiempo real; en general pueden monitorizarse *on-line*, evitando los problemas que se tienen con las determinaciones en fase líquida (toma de muestra, preparación y análisis de la muestra) o el ensuciamiento de sensores en contacto con la fase líquida cuando se miden directamente los indicadores. Los principales indicadores en la fase gas son: producción de biogás, composición del biogás y concentraciones de gases traza como el hidrógeno y el monóxido de carbono. Diferentes investigadores han propuesto el uso de los gases traza hidrógeno y monóxido de carbono, como indicadores del estado del proceso (Archer *et al.*, 1986; Hickey *et al.*, 1987; Moletta, 1989; Switzembaum *et al.*, 1990; Slater *et al.*, 1990; Mathiot *et al.*, 1992; Moletta *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2000).

Conrad and Thauer (1983) son los primeros en publicar resultados sobre la formación biológica de CO bajo condiciones estrictamente anaerobias, encontrando

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

concentraciones de 30 a 90 ppm de CO en biogás en ensayos realizados utilizando como sustrato H₂/CO₂ (80/20%) y como biomasa un cultivo puro de *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Explican este fenómeno indicando que el CO puede generarse cuando se sintetiza la enzima acetyl-CoA desde 2CO₂. Posteriormente Hickey *et al* (1989), utilizando metales pesados (cobre, zinc y cadmio) como inhibidores de la digestión anaerobia, encontraron en paralelo la disminución en la producción de metano, la disminución en la concentración de hidrógeno y el aumento en la concentración del monóxido de carbono. Los autores plantean que la inhibición en la producción de metano no necesariamente significa que la metanogénesis fue inhibida, es posible que otros microorganismos diferentes a los metanogénicos sufran inhibición alterando toda la cadena trófica.

El efecto de sobrecargas orgánicas en la concentración del hidrógeno en fase gaseosa fue estudiado por Archer *et al.* (1986) en un digestor de 6 m³ tratando aguas residuales de una cervecera. Dichos investigadores comprobaron durante dos sobrecargas orgánicas que la concentración de hidrógeno disuelto aumentó de 15 a 100 ppm en un tiempo de 3 a 6 horas.

Hickey *et al.* (1987), exponiendo biomasa anaerobia a tóxicos orgánicos en ensayos tipo batch en botellas serológicas, encontraron paralela a la inhibición de la producción de metano, la acumulación de hidrógeno en la fase gaseosa. Las concentraciones de hidrógeno en el biogás de digestores de lodos fueron determinadas por Collins and Paskins (1987), encontrando concentraciones en el rango de 15 a 199 ppm.

Harper and Pohland (1987), estudiaron el efecto de perturbaciones tipo pulso en varias configuraciones de reactores y con varios sustratos, evaluando las concentraciones de hidrógeno en el biogás. Estos autores consideran que el hidrógeno es uno de los intermediarios más importantes en el proceso de digestión anaerobia debido a que su concentración afecta el potencial de conversión de sustrato del principal grupo de bacterias anaerobias. En fase gas, el hidrógeno es fácil de medir y ofrece características excelentes para ser monitorizado en forma continua y permitir el control automático del proceso. Al realizar experimentos de sobrecarga orgánica y pulsos de glucosa, AGV e hidrógeno, comprobaron que la concentración de hidrógeno en la fase gas se comporta en forma proporcional a los pulsos alcanzando concentraciones de 100 a 10000 ppm, dependiendo de la configuración del sistema.

Moletta (1989), estudió el comportamiento de los principales parámetros (pH, alcalinidad, AGVs, concentración de hidrógeno en el biogás y composición del biogás) en un filtro anaerobio sometido a sobrecargas orgánicas cortas. El autor propone dos tipos de parámetros para el control óptimo del proceso: parámetros

con tiempo de respuesta corto, alta sensibilidad y permanencia en el tiempo corta (se usarían para identificar el inicio de una sobrecarga, como la concentración de hidrógeno en el biogás) y parámetros con tiempos de respuesta muy largos (que permitirían detectar el final de la sobrecarga, como el pH por ejemplo).

Slater *et al.* (1990), trabajando con un reactor de lecho fluidizado alimentado con butirato, evaluaron la respuesta de los indicadores de la fase gas: CH₄, CO₂, H₂ y CO; y AGV (C1 a C4) en la fase líquida. Concluyen dichos investigadores que el hidrógeno es el indicador más adecuado para ser utilizado como variable de control debido a sus características de ser regulador de la actividad metabólica y tener respuesta rápida y alta sensibilidad a corto plazo.

Kidby and Nedwell (1991), investigaron la utilidad de monitorizar el hidrógeno en fase gaseosa como indicador del rendimiento en digestores de lodos, al reducir el TRH de 20 a 8 días no se presentó acumulación de hidrógeno en el biogás; sin embargo antes de fallar el proceso se detectó un aumento importante en la concentración de hidrógeno. Concluyen que la concentración de hidrógeno en la fase gas no es un buen indicador cuando se trata de sobrecargas hidráulicas en digestores de lodos.

Hickey and Switzenbaum (1990, 1991), evaluaron la respuesta del hidrógeno y el monóxido de carbono en la detección de sobrecargas orgánicas e hidráulicas en digestores anaerobios. Encontraron relación directa entre los incrementos de carga (orgánica e hidráulica) y el aumento de la concentración de hidrógeno en la fase gas; adicionalmente encontraron una fuerte relación entre el aumento de la concentración de AGV y el aumento de la concentración de CO en la fase gas.

Mathiot *et al.* (1992), evaluaron diferentes parámetros de control (H₂, CH₄, CO₂ en la fase gas y producción de gas; pH, temperatura, TOC y AGV en la fase líquida) en un filtro anaerobio sometido a sobrecargas orgánicas. Estudiaron perturbaciones tipo pulso y escalón, además del enfriamiento del reactor. Los autores proponen la utilización en la fase gas de los parámetros: concentraciones de hidrógeno, metano y CO₂, además de la tasa de producción de gas; acompañados del pH en la fase líquida.

Jones *et al.* (1992), trabajando con un filtro anaerobio piloto realizaron sobrecargas con ácido acético, ácido propiónico y glucosa, observando en la fase gas una respuesta rápida de la concentración de hidrógeno con valores que oscilaron entre 30 y 600 ppm, para los AGV y la glucosa, respectivamente. En los experimentos realizados con glucosa, la dinámica de la concentración de hidrógeno en fase gas es similar a la dinámica de la concentración de AGV en la fase líquida.

Moletta *et al.* (1994), desarrollaron un sistema automático de control a partir de datos obtenidos en un reactor de lecho fluidizado, identificando parámetros

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

sensibles a sobrecargas con vinazas como agua residual: pH, producción de biogás y concentración de hidrógeno en fase gas. El sistema automático de control calcula el caudal de alimentación procurando ajustar la VCO aplicada. El sistema fue utilizado para monitorizar y controlar diferentes tipos de sobrecargas en filtros anaerobios a escala de laboratorio y piloto.

Guwy *et al.* (1997), comprobaron en un reactor anaerobio de lecho fluidizado utilizando agua residual sintética de levadura de panadería, la respuesta en la concentración de hidrógeno en fase gas frente a sobrecargas tipo pulso. La concentración del hidrógeno varió de 290 a 640 ppm frente a un cambio de la VCO de 40 a 63 kg DQO/m³-d. Sin embargo cuando se utiliza alimentación fresca la concentración de hidrógeno en el biogás se incrementa de 200 a 800 ppm. De acuerdo con lo anterior el contenido de hidrógeno en el biogás no es un parámetro adecuado por si solo para el control de reactores anaerobios; pero su rápida respuesta frente a sobrecargas orgánicas soporta la opción de utilizarlo en control acompañado de otro parámetro de la fase líquida que pueda ser monitorizado fácilmente *on-line*.

Huang *et al.* (2000), evaluaron la concentración de hidrógeno como indicador de sobrecargas orgánicas en un reactor UASB de laboratorio alimentado con aguas residuales de la fabricación de polietileno tereftalato (PET). De acuerdo con los resultados obtenidos los autores concluyen que los parámetros del biogás (concentración de H₂ y tasa de producción de biogás) son los más sensibles a sobrecargas orgánicas.

De la revisión bibliográfica se desprende que se han desarrollado numerosos estudios y propuestas de indicadores para la detección de perturbaciones en digestores anaerobios. Por lo tanto, no existe una conclusión general sobre el mejor indicador o grupo de indicadores que describan el proceso y que permitan la identificación de condiciones no estables o la diagnosis del estado del sistema. Adicionalmente en la mayoría de las investigaciones referenciadas se comparan solo pequeños grupos de indicadores, utilizando además, diferentes tipos de aguas residuales y siguiendo criterios heurísticos para la selección de indicadores.

El presente trabajo se orienta a sistematizar el estudio de indicadores para dos aguas residuales tipo (carbohidratos y proteína) en planta piloto; comparando los mejores indicadores para clasificar los diferentes estados estacionarios con los indicadores que alertan en forma temprana la ocurrencia de una perturbación. El estudio pretende compatibilizar ambos grupos de indicadores, simplificando el número y la complejidad de las variables a monitorizar con el fin de optimizar recursos y posibilitar la implementación a escala industrial de sistemas de monitorización robustos y de bajo coste.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Equipo experimental y aguas residuales tipo

Se utilizó la planta piloto anaerobia descrita en el capítulo 2. Previamente se realizó la aclimatación a los sustratos durante un período mínimo de 2 meses. Inicialmente se cambió del sustrato etanol a hidratos de carbono y posteriormente de hidratos de carbono a proteína hidrolizada.

Los sustratos utilizados dextrina y proteína hidrolizada fueron descritos en el capítulo 2. Los experimentos representativos del agua residual tipo carbohidratos se realizaron utilizando como única fuente de carbono la dextrina para condiciones iniciales, pulsos y escalones. En el caso de los experimentos con el agua residual tipo proteína y debido a la baja actividad metanogénica inicial de la biomasa, se utilizaron diferentes combinaciones de proteína hidrolizada y etanol para las condiciones de línea base; dichas combinaciones se presentan en la Tabla 4.1. Los pulsos y escalones se realizaron aumentando la DQO de entrada utilizando solo proteína hidrolizada. A partir del día 63 (1500 h) de experimentación se utilizó solo proteína como fuente de carbono.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales en el desarrollo de estados estacionarios para el sustrato tipo proteína.

Estado estacionario	VCO (kg DQO·m ⁻³ ·d ⁻¹)	Composición del sustrato (%)	
		Proteína	Etanol
1	2	100	0
2	3	67	33
3	4	50	50
4	4	100	0
5	6	67	33
6	6	67	33

4.2.2 Protocolo de experimentación

Condiciones de experimentación

Las condiciones de experimentación tanto para estados estacionarios como en las perturbaciones tipo pulso y escalón, fueron: temperatura 37 ± 2 °C, caudal de alimentación $48,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, caudal de recirculación $200 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. Previo a cada experimento de sobrecarga se mantuvo la VCO constante durante al menos 5 días con el fin de garantizar condiciones de estado estacionario. Las sobrecargas orgánicas se realizaron manteniendo el caudal de alimentación constante y aumentando la DQO del sustrato. Los pulsos tuvieron una duración de 2,4 h (valor correspondiente al 10

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

% del TRH) y se incrementó la DQO de entrada en una relación de 5 a 10 veces el valor del estado estacionario inmediatamente anterior. Los escalones se realizaron aumentando la DQO de entrada en una relación de 1,5 a 3 veces su valor en el estado estacionario anterior. Durante los pulsos no se variaron las concentraciones de nutrientes (macro y micro); mientras que en los escalones se aumentaron las cantidades de nutrientes proporcionalmente al aumento de la DQO.

Pulsos y escalones

Las perturbaciones tipo pulso tienen como objetivo estudiar la dinámica de la respuesta de las diferentes variables frente a una sobrecarga orgánica importante de corta duración. De esta manera se puede evaluar tanto la aparición como la desaparición del efecto provocado por la sobrecarga en los diferentes parámetros (Moletta *et al.*, 1994). De otro lado las perturbaciones tipo escalón permiten evaluar la dinámica de ajuste del sistema frente a un cambio sostenido en la velocidad de carga orgánica (VCO).

Para diseñar los experimentos, se realizó una evaluación inicial por simulación del efecto de las perturbaciones (pulsos y escalones de VCO) con el fin de evitar la desestabilización completa del reactor y obtener datos fiables relacionados con señales tempranas de perturbaciones. Para lo cual se utilizó el modelo IWA Anaerobic Digestion Model nº1 (ADM1) (Batstone *et al.*, 2002). El ADM1 es un modelo complejo que incorpora las diferentes etapas del proceso de digestión anaerobia como hidrólisis de materiales particulados, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Se utilizó una versión modificada del ADM1 que incorpora la ruta de degradación del etanol (Ruiz *et al.*, 2004b), programada en Matlab Simulink para un reactor de mezcla completa. Previamente se calibró dicha versión para el reactor anaerobio USBF de la planta piloto utilizando los datos experimentales iniciales.

A través de las simulaciones se seleccionaron las VCO para pulsos y escalones así como el tiempo de duración de los pulsos; buscando perturbaciones que generaran cambios importantes en las variables de interés pero que no desestabilizaran el proceso ni generaran inhibición. El modelo fue previamente calibrado para el estado estacionario inicial. Un parámetro fundamental en esta calibración es el tiempo de retención de sólidos del reactor, dicho parámetro se estimó para cada sustrato a partir de los valores de TOC de salida sin filtrar y el TOC de salida filtrado; de esta manera se calculó la cantidad de carbono particulado que sale diariamente del reactor y por lo tanto la cantidad de biomasa asumiendo que todo el carbono particulado es biomasa. El TRS se obtiene utilizando la ecuación 4.5.

$$TRS = \frac{X_{Total}}{(\Delta X / \Delta t)} \quad (\text{Ec. 4.5})$$

Donde:

TRS : Tiempo de retención de sólidos (d)

X_{Total} : Biomasa total en el reactor, obtenida por el perfil de lodos (kg SSV)

$(\Delta X / \Delta t)$: Promedio de biomasa que sale del reactor por día (kg SSV·d⁻¹)

A su vez $(\Delta X / \Delta t)$ se calcula utilizando los datos de TOC de salida sin filtrar y filtrado de acuerdo con la ecuación 4.6.

$$(\Delta X / \Delta t) = \frac{(TOC_e - TOC_f) \cdot Q \cdot 24}{10^3} \cdot \frac{113}{60} \quad (\text{Ec. 4.6})$$

Siendo:

TOC_e : TOC efluente sin filtrar promedio en el intervalo de tiempo evaluado (mg·L⁻¹)

TOC_f : TOC efluente filtrado promedio en el intervalo de tiempo evaluado (mg·L⁻¹)

Q : Caudal promedio de entrada en el intervalo de tiempo evaluado (L·h⁻¹)

(113/60): Relación peso molecular biomasa/peso carbono por un Mol de biomasa utilizando la ecuación general de la biomasa C₅H₇NO₂

Choque térmico

Se estudió la respuesta de las variables monitorizadas a la disminución de temperatura en el reactor, para lo cual se simuló el fallo del sistema de calentamiento, permitiendo que la temperatura dentro del reactor se redujera gradualmente de 37 a 25 °C sin cambiar la velocidad de carga orgánica (VCO). Esta perturbación corresponde a un cambio tipo escalón realizado en forma gradual (debido a que la temperatura disminuye lentamente por la inercia del sistema). De esta manera se evaluó un fallo típico de reactores a plena escala.

Comportamiento hidráulico

Con el fin de evaluar el tiempo de respuesta relacionado con las características geométricas, dimensiones y condiciones de operación del reactor; se determinó el modelo de flujo para cada sustrato, utilizando la técnica de estímulo-repuesta con un trazador (Levenspiel, 1995). El trazador seleccionado fue cloruro de litio (LiCl), el procedimiento consiste en inyectar un pulso de 30 g de LiCl en la línea de entrada al reactor y posteriormente determinar la concentración de Litio en el efluente en diferentes fracciones tomadas a intervalos de tiempo pequeños (1 a 2 horas en nuestro caso). La concentración de Litio en dichas alícuotas se determinó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer ICP/5000.

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

El tiempo de respuesta para la fase líquida se toma como el tiempo transcurrido entre la inyección del trazador (sustancia conservativa) y la presencia de la concentración máxima de trazador en el efluente. No se realizaron determinaciones de tiempo de respuesta de la fase gas debido a que dicho tiempo es muy corto (5 a 10 minutos) (Mathiot *et al.*, 1992) y en la práctica se puede despreciar si se compara con el tiempo de evolución de los indicadores de la fase gas.

4.2.3 Variables estudiadas

En la Tabla 4.2 se presentan las variables estudiadas tanto en la selección del número mínimo de variables que permiten clasificar adecuadamente los estados estacionarios; como las variables analizadas en la respuesta del sistema ante perturbaciones en la concentración de materia orgánica o en la temperatura del proceso.

Tabla 4.2. Variables utilizadas en la determinación del número mínimo de variables que permiten caracterizar el estado del proceso.

Variable	Abreviatura	Unidades	Variables estudiadas	
			Detección de estados estacionarios	Evaluación de perturbaciones
Presión de cabeza	Pcabeza	mbar	✓	
Concentración de metano en fase gas	%CH ₄	%	✓	✓
Concentración de hidrógeno en fase gas	H ₂	ppm	✓	✓
Concentración de monóxido de carbono en fase gas	CO	ppm		✓
Caudal de biogás	QBiogás	L·h ⁻¹	✓	✓
Caudal de metano	QCH ₄	L·h ⁻¹	✓	✓
Carbono orgánico total en la entrada	TOCe	mg·L ⁻¹	✓	
Carbono inorgánico total en la entrada	TICe	mg·L ⁻¹	✓	
Carbono orgánico total en la salida	TOCs	mg·L ⁻¹	✓	✓
pH en la salida	pHs		✓	✓
Concentración de ácidos grasos volátiles en la salida	AGV	mg·L ⁻¹	✓	✓
Alcalinidad parcial	AP	meq·L ⁻¹	✓	✓

En el proceso de selección del número mínimo de variables que permiten clasificar diferentes estados estacionarios se evaluaron once variables. Incluyendo

variables que caracterizan la entrada del proceso como carbono orgánico total de entrada (TOCe) y carbono inorgánico total de entrada (TICe), así como variables que caracterizan la respuesta del proceso tanto en la fase gas como en la fase líquida.

Las variables caudal de entrada, caudal de recirculación, temperatura de entrada y temperatura en el reactor; no se consideraron en el análisis ya que son variables controladas en un valor constante durante la experimentación. Estas variables usualmente se controlan con relativa facilidad (intercambiador de calor para mantener la temperatura; caudalímetros y variadores de frecuencia de bombeo para mantener los caudales).

4.2.4 Metodología de determinación del número mínimo de variables para clasificar estados estacionarios

El procedimiento de determinación y selección del número mínimo de variables se esquematiza en la Figura 4.2; inicialmente se realiza una selección con criterio de experto de los diferentes estados estacionarios resultantes en la experimentación; luego se procede a estandarizar los datos (media cero y varianza uno).

Posteriormente se reduce la dimensión del problema de 11 a 2 utilizando el análisis de componentes principales (PCA). A continuación se realiza la clasificación de estados estacionarios sobre las dos componentes principales utilizando la técnica de regresión lineal sobre una ventana móvil.

Luego de realizar pruebas preliminares se seleccionó una ventana de 20 datos correspondiente a un tiempo de retardo de 5 horas (20 mediciones cada 15 minutos) como la ventana más adecuada y que genera una mejor clasificación de los datos. De otro lado el tiempo de retardo de 5 horas es aproximadamente el 20% del TRH utilizado en los experimentos (24 horas) con lo cual se respeta la influencia de dicho tiempo característico del proceso.

Por la técnica de FDA se evalúa la clasificación en los diversos estados estacionarios con las 11 variables en estudio, por último se estudia la clasificación en los mismos estados estacionarios, utilizando una variable y combinaciones de dos ó tres variables. De esta manera se obtiene una primera clasificación de variables de acuerdo con su capacidad discriminante de los estados estacionarios.

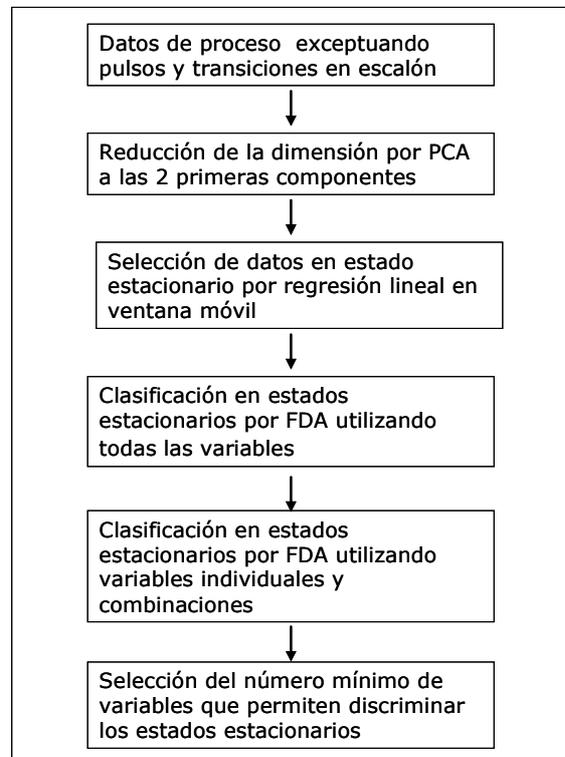


Figura 4.2. Esquema de la metodología utilizada para determinar y seleccionar el número mínimo de variables necesarias para clasificar los estados estacionarios.

4.2.5 Metodología de selección de variables para la identificación de sobrecargas orgánicas

En las perturbaciones tipo pulso y escalón se evaluaron para cada variable los siguientes parámetros: i) tiempo hasta valor máximo; ii) nivel de excitación calculado como la variación de la señal con respecto a su valor inicial de acuerdo con la ecuación 4.7 y iii) pendiente normalizada de la señal de respuesta utilizando la ecuación 4.8. Adicionalmente en las perturbaciones tipo escalón se determinó el tiempo a pendiente máxima de la respuesta, utilizando la técnica de correlaciones cruzadas entre la variable independiente, en este caso el cambio en la VCO y las variables dependientes (cada una de las variables monitorizadas como respuesta a la perturbación).

$$N_e = \frac{(V_f - V_i)}{V_i} \quad (\text{Ec. 4.7})$$

Donde:

N_e : Nivel de excitación, parámetro adimensional

V_f : valor final de la variable

V_i : valor inicial de la variable

$$P_n = \frac{P}{V_i} \quad (\text{Ec. 4.8})$$

Donde:

P_n : pendiente normalizada de la señal de respuesta en h^{-1}

P : pendiente de la señal de respuesta

V_i : valor inicial de la variable

El nivel de excitación y la pendiente normalizada de la señal de respuesta expresan respectivamente la sensibilidad y la velocidad de respuesta de cada variable estudiada frente a las perturbaciones (Ruiz *et al.*, 2002).

La pendiente normalizada engloba los parámetros nivel de excitación y tiempo hasta la respuesta máxima; aproximadamente el valor de la pendiente normalizada resulta de dividir el nivel de excitación por el tiempo a respuesta máxima. Si el nivel de excitación es alto y el tiempo a respuesta máxima tiene un valor bajo; entonces la pendiente normalizada presentará un valor alto indicando que la variable presenta sensibilidad y velocidad de respuesta altas. Por lo tanto la pendiente normalizada se utilizará como parámetro clave en la identificación de las variables más adecuadas en la detección temprana de perturbaciones.

De acuerdo con lo anterior en la detección de perturbaciones es más adecuado evaluar la tasa de cambio relativo de la variable con el tiempo que el valor puntual de la variable; de esta manera se puede determinar *on-line* la pendiente normalizada del cambio en la variable de interés. De aquí en adelante se hace referencia a las variables con el doble significado: valor puntual y pendiente normalizada (tasa de cambio relativo con el tiempo).

Se utilizó como parámetro adicional el tiempo hasta la pendiente máxima evaluado en las perturbaciones tipo escalón. Dicho parámetro se evaluó a través de la correlación cruzada entre la variable exógena; en este caso la carga aplicada al proceso (VCO); y las variables respuesta (%CH₄, H₂, QBiogas, QCH₄, DOCs, AGV y AP). El correlograma indicará el número de retardos en el cual existe mayor correlación entre ambas variables y por lo tanto el tiempo en el que se presenta una mayor velocidad de respuesta en la variable estudiada. En otras palabras un cambio en la VCO tiene su máxima influencia en la variable respuesta transcurrido el número de retardos encontrado al realizar la correlación cruzada.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Selección de variables en estados estacionarios

Selección inicial de estados estacionarios

Inicialmente se procedió a eliminar los datos pertenecientes a estados transitorios de las perturbaciones tipo pulso y las transiciones en escalón, esta operación se realizó combinando la información suministrada por las variables de la fase gas (QBiogas, %CH₄ y H₂) y la fase líquida (AGV y AP). Como resultado de esta operación se obtuvieron 3 estados pseudo-estacionarios para el agua residual tipo carbohidratos y 6 estados pseudo-estacionarios para el agua residual tipo proteína.

Reducción de la dimensión

Sobre los datos clasificados en estados pseudo-estacionarios se realizó la reducción de la dimensión mediante PCA; normalizando previamente los datos de las 11 variables estudiadas (restando la media y dividiendo por la varianza). Una vez realizada la reducción de la dimensión se obtuvo con las dos primeras componentes principales una retención de la varianza de los datos del 81,8 % y 84,2 % para los sustratos tipo carbohidratos y tipo proteína, respectivamente. De esta manera se garantiza la representatividad de las dos primeras componentes principales para ambos conjuntos de datos. En las figuras 4.3 y 4.4 se presentan los diagramas de Pareto para los dos sustratos tipo, indicando en ellos la varianza explicada por cada componente principal y la varianza acumulada.

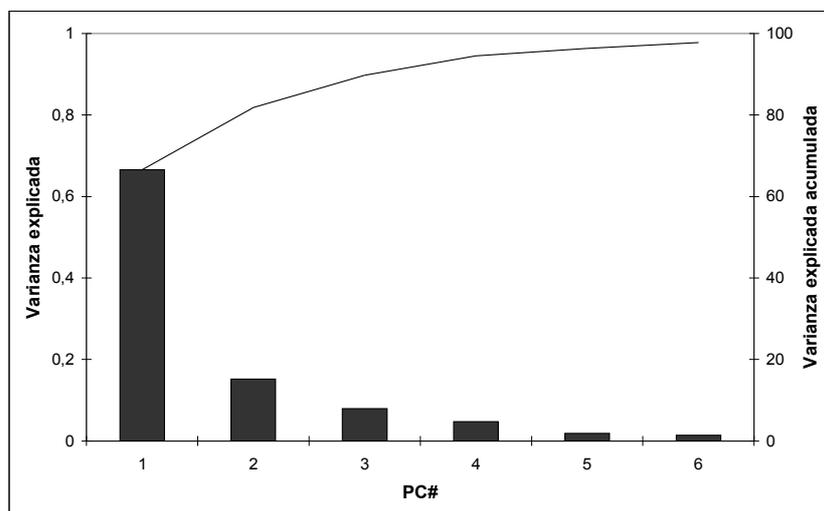


Figura 4.3. Diagrama de Pareto para el sustrato hidratos de carbono, indicando la varianza explicada por cada componente principal (■) y la varianza acumulada (—).

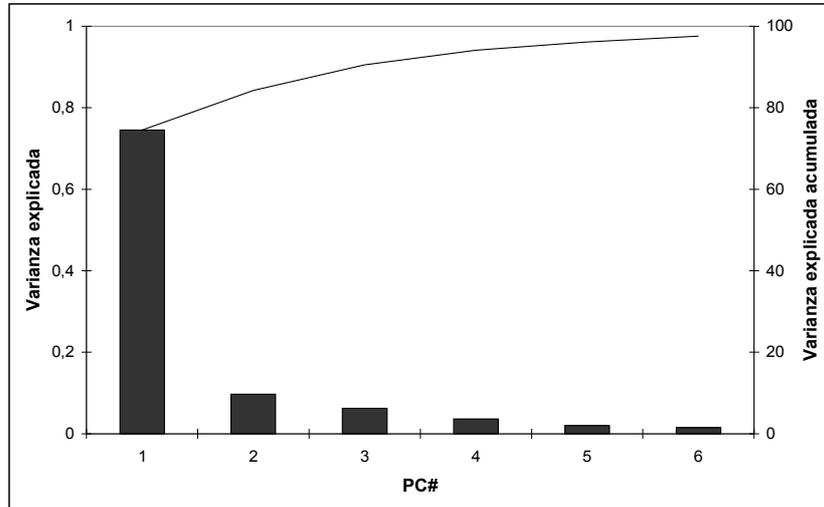


Figura 4.4. Diagrama de Pareto para el sustrato tipo proteína, indicando la varianza explicada por cada componente principal (■) y la varianza acumulada (-).

La Tabla 4.3 presenta, para ambos sustratos, los valores de los coeficientes de la matriz P, dichos coeficientes se utilizan para calcular las dos primeras componentes principales como combinación lineal de los datos originales. De esta manera se reduce el problema de dimensión 11 a dimensión 2.

Tabla 4.3. Valores de las dos primeras columnas de la matriz P para los dos sustratos; a partir de dichos valores se obtienen las dos primeras componentes principales

Variable	Hidratos de carbono		Proteína hidrolizada	
	P(1)	P(2)	P(1)	P(2)
Pcabeza	0,1305	-0,0759	0,1125	0,3114
%CH ₄	-0,1200	0,1639	-0,1060	0,2259
H ₂	0,0799	-0,2870	0,0950	0,4167
QBiogas	0,1308	-0,0723	0,1139	0,3010
QCH ₄	0,1264	-0,0510	0,1086	0,3804
TOCe	0,1241	0,0099	0,1157	-0,1532
TICe	0,1148	0,2578	0,0862	-0,3317
TOCs	0,1101	-0,1025	0,1048	-0,3482
pHs	0,0573	0,4786	0,1033	0,0677
AGV	0,1134	-0,1325	0,1108	-0,2329
AP	0,0938	0,3890	0,0979	-0,2517

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

En la Tabla 4.3 se puede observar que existen diferencias significativas en la estructura de los factores que permiten calcular las componentes principales para cada sustrato; estas diferencias se reflejan especialmente en los signos de cada factor.

Calculo de las dos primeras componentes principales para todos los datos

Se realizó el cálculo de las dos primeras componentes principales para todos los datos (incluyendo pulsos y transiciones en escalón) a partir de las dos primeras columnas de la matriz de coeficientes P encontrada en el apartado anterior (Tabla 4.2).

Clasificación de datos en estado estacionario

Utilizando las dos primeras componentes principales se procedió a identificar los datos pertenecientes a estados estacionarios a través de la prueba del estadístico t como se explicó en el apartado 4.1.1. En las Figuras 4.5 y 4.6 se muestran los resultados de esta clasificación para los dos sustratos en estudio.

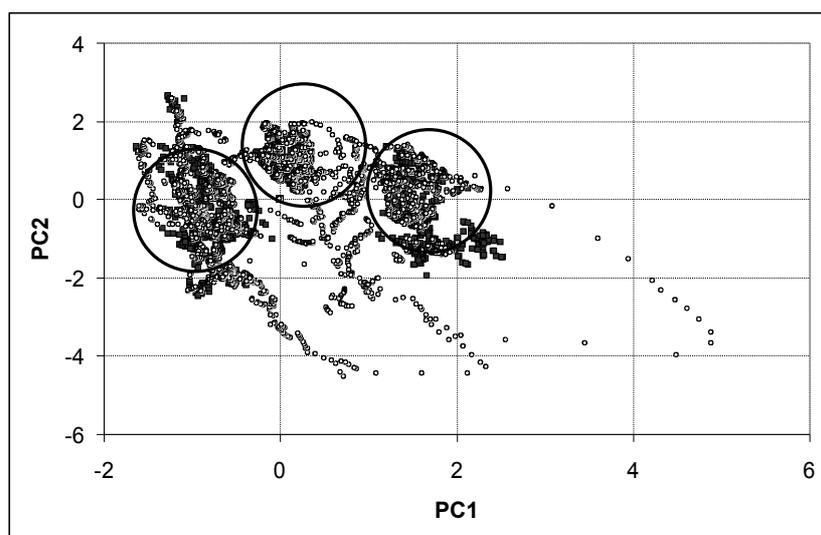


Figura 4.5. Resultados de la clasificación en estados estacionarios (■) y no estacionarios (O) para el sustrato hidratos de carbono proyectando las dos primeras componentes principales.

En la Figura 4.5 se pueden observar los 3 grupos de datos (señalados con un círculo) correspondientes a los 3 estados estacionarios diferentes asociados a las VCO aplicadas. Así mismo se observan las trayectorias de los datos durante las perturbaciones tipo pulso y las transiciones entre estados estacionarios generadas

por los cambios en la VCO en forma de escalones. Debe recordarse que la clasificación de datos en estados estacionarios es un análisis temporal y que, por tanto, el clasificar ó no un dato como estacionario depende además de su localización con respecto a las dos primeras componentes principales, de la trayectoria de datos en el tiempo.

En la Figura 4.6, donde se muestran los resultados obtenidos con el sustrato tipo proteína, los 6 estados estacionarios no se encuentran tan bien definidos.

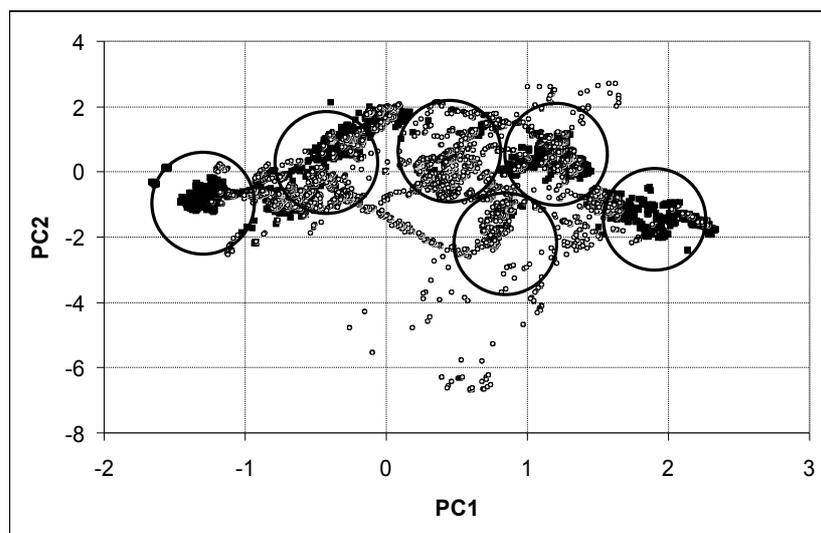


Figura 4.6. Resultados de la clasificación en estados estacionarios (■) y no estacionarios (○) para el sustrato proteína proyectando las dos primeras componentes principales.

4.3.2. Determinación del número mínimo de variables para la identificación de diferentes estados estacionarios

Clasificación utilizando todas las variables

Los datos clasificados en estado estacionario en el apartado anterior para los dos sustratos, se utilizaron en la determinación del número mínimo de variables que permiten discriminar adecuadamente los diferentes estados estacionarios. Para esto se utilizó la técnica de análisis factorial discriminante (FDA) introducida en el apartado 4.1.2. Inicialmente se procedió a obtener la máxima capacidad de clasificación, para lo cual se realizó el FDA utilizando todas las variables. Obteniendo para los sustratos tipo hidratos de carbono y proteína, respectivamente el 99,5 % y el 100% de clasificación correcta de los datos en los diferentes estados estacionarios.

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

En las Figuras 4.7 y 4.8 se presenta para ambos sustratos, el mapa territorial generado al realizar el FDA utilizando todas las variables. En la Figura 4.7 puede observarse que los estados estacionarios para el sustrato tipo hidratos de carbono son adecuadamente separados al realizar el FDA. Correspondiendo los estados estacionarios 1, 2 y 3 a las VCO aplicadas 3,5; 5 y 7,5 kg DQO·m⁻³·d⁻¹ respectivamente. La función de clasificación 1 por si sola separa casi completamente los 3 estados estacionarios; quedando ordenados de izquierda a derecha sobre el eje correspondiente a la función de clasificación 1. Solo en el estado estacionario 1 se presenta error en la clasificación, algunos datos son asignados al estado estacionario 2. El estado estacionario 1 es clasificado con 99,1 % de acierto; incidiendo el mencionado error en el valor final de clasificación de 99,5%.

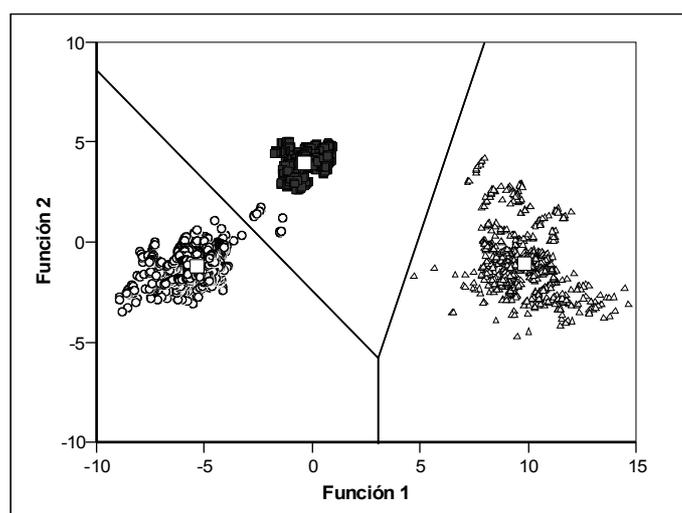


Figura 4.7. Mapa territorial de los estados estacionarios discriminados por FDA utilizando todas las variables para el sustrato tipo carbohidratos. Centroides (□); Estados estacionarios: 1(O), 2(■) y 3(△).

Las situación con el sustrato tipo proteína es más compleja debido a que en la operación de la planta piloto se aplicaron 4 VCO diferentes, con una pareja de VCO iguales en carga pero con diferente composición del sustrato (mezclas de proteína y etanol) como lo muestra la Tabla 4.1. Adicionalmente el rango de las VCO aplicadas fue estrecho debido a problemas operacionales en el reactor; lo que dificulta la separación de los estados estacionarios. Sin embargo, el FDA se discrimina con 100 % de acierto los 6 estados estacionarios.

En la figura 4.8 se puede observar que la función discriminante 1 separa parcialmente los diferentes estados estacionarios, los cuales se localizan de izquierda a derecha de acuerdo con el aumento de la VCO aplicada. Los estados estacionarios 5 y 6 corresponden a la misma VCO ($6 \text{ kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$) pero comprenden períodos de tiempo diferentes (transcurrieron 25 días de operación entre ambos estados estacionarios) y por lo tanto presentan valores diferentes en ambas funciones de clasificación; esta situación es un buen ejemplo de que las mismas condiciones operacionales pueden generar estados estacionarios diferentes debido posiblemente a cambios en la biomasa.

Los estados estacionarios 3 y 4 también corresponden a una misma VCO aplicada ($4 \text{ kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$), sin embargo la composición del sustrato es diferente (ver Tabla 4.3). Ambas funciones discriminantes identifican dicha diferencia (ver centros de gravedad de ambos estados).

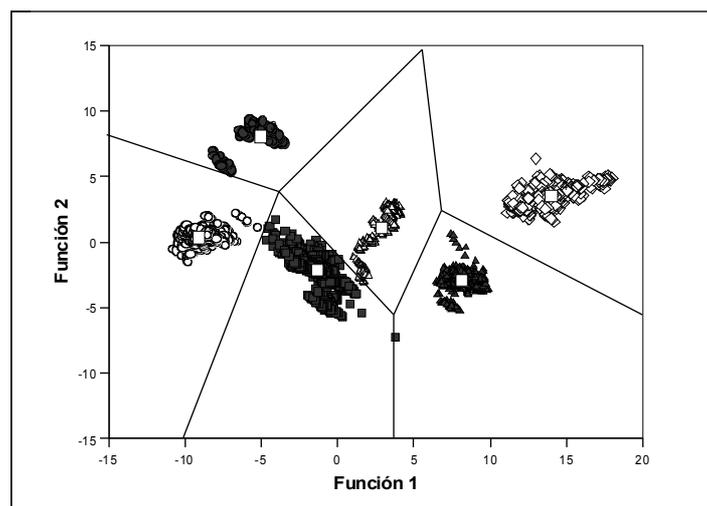


Figura 4.8. Mapa territorial de los estados estacionarios discriminados por FDA utilizando todas las variables para el sustrato tipo proteína. Centroides (\square); Estados estacionarios: 1(\circ), 2(\bullet), 3(\blacksquare), 4(\triangle), 5(\blacktriangle) y 6(\diamond).

Clasificación con una variable

En la Tabla 4.4 se presentan para los dos sustratos estudiados, los porcentajes de acierto en la clasificación por la técnica de FDA utilizando una sola variable. Para el sustrato tipo carbohidratos las variables que mejor clasifican los estados estacionarios (90% de acierto) están relacionadas con la fase gas y son Pcabeza, QBiogas y QCH₄. Se debe recordar que las variables QBiogas y Pcabeza presentan

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

una correlación con coeficiente R^2 de 0,98 (ver apartado 2.3.3 del capítulo 2) y, por tanto, no son variables independientes, por lo cual se puede excluir una de ellas. Por su parte la variable QCH_4 es el producto de las variables $QBiogas$ y $\%CH_4$; teniendo en cuenta que el metano es el principal producto final del proceso de digestión anaerobia, la variable QCH_4 es muy atractiva ya que ofrece información sobre la actividad de la biomasa metanogénica.

En segundo lugar las variables que mejor clasifican (85% de acierto) hacen referencia a la caracterización del agua residual sintética y son: $TOCe$ y $TICe$. Por último las variables respuesta en fase líquida AP y AGV , presentan porcentajes de acierto de alrededor del 80%.

El mayor acierto en la clasificación de los estados estacionarios por parte de las variables de fase gas como $Pcabeza$, $QBiogas$ y QCH_4 , posiblemente este relacionado con la rápida biodegradación del sustrato tipo carbohidratos; con lo cual los diferentes estados estacionarios se encuentran muy bien caracterizados por las variables relacionadas con la producción de biogás.

Tabla 4.4. Porcentaje de acierto en la clasificación de los diferentes estados estacionarios utilizando una sola variable

Variable	Sustrato tipo carbohidratos	Sustrato tipo proteína
$Pcabeza$	89,9	58,3
$\%CH_4$	74,5	53,4
H_2	53,6	46,7
$QBiogas$	91,4	59,0
QCH_4	91,7	65,8
$TOCe$	89,4	78,8
$TICe$	85,1	82,6
$TOCs$	72,9	70,3
pHs	63,6	51,3
AGV	81,5	65,2
AP	81,4	73,9

Para el sustrato proteína se presentan valores menores en el acierto de clasificación con una variable; las dos variables que por separado mejor clasifican son $TOCe$ y $TICe$ y están relacionadas con las características del agua residual que entra al proceso. De las cuatro variables respuesta que presentan mayor acierto en la clasificación, tres pertenecen a la fase líquida: AP , $TOCs$ y AGV ; y una la fase gas (QCH_4).

El menor acierto en la clasificación de los diferentes estados estacionarios para el sustrato proteína utilizando una variable, puede estar relacionado con la mayor complejidad del sustrato, el mayor número de estados estacionarios estudiados y el menor rango de VCO aplicadas en la experimentación; esta situación se refleja gráficamente en la menor separación de los grupos obtenida en la Figura 4.8.

Para ambos sustratos la concentración de H_2 en fase gas, es la variable que clasifica más pobremente los diferentes estados estacionarios. Dicho resultado difiere de lo encontrado por Ruiz (2005a) y Castellano *et al.* (2007) utilizando un sustrato rico en etanol; dichos investigadores reportan la variable concentración de H_2 como una de las variables con mayor poder de clasificación de estados estacionarios estudiados.

Para el sustrato tipo proteína, debido a que se trabajó con mezclas de proteína y etanol en la primer parte del experimento y solo proteína en la segunda parte del experimento se presenta gran variabilidad en la concentración de H_2 en la fase gas y por esta razón dicha variable no permite una discriminación adecuada de los diferentes estados estacionarios.

Para el sustrato tipo hidratos de carbono, la concentración de hidrógeno presenta amplias variaciones dependiendo del grado de acidificación del sustrato (Guwy *et al.*, 1997). La Figura 4.9 ilustra esta problemática; dicha figura presenta la variación de la concentración de H_2 al realizarse el cambio a sustrato fresco. La concentración de hidrógeno pasa de 50 a 150 ppm debido a que la acidificación del sustrato ocurre dentro del reactor; mientras que el caudal de CH_4 se mantiene casi constante y no existe una variación importante en la concentración de carbono orgánico total a la entrada (TOCe).

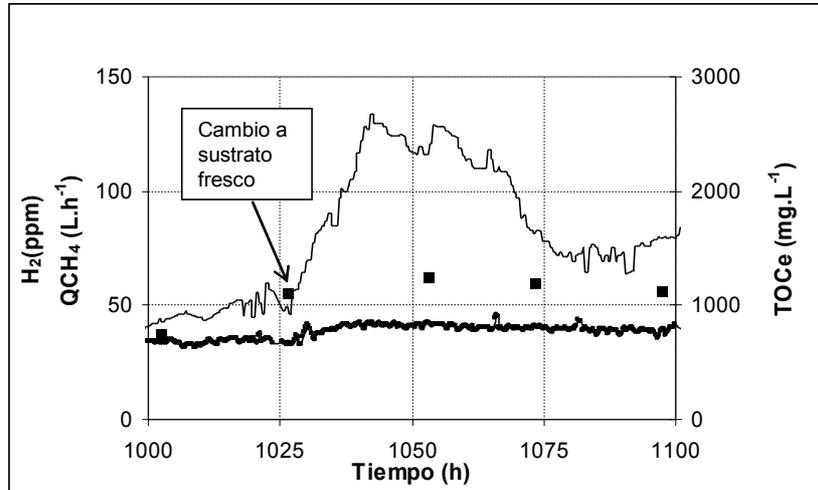


Figura 4.9. Variación de la concentración de H_2 (—) en fase gas cuando se realiza el cambio a sustrato fresco; TOCe (■) y QCH_4 (○).

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

El aumento en la concentración de H₂ generado por el cambio a sustrato fresco es similar al ocasionado por una perturbación tipo pulso (ver Figura 4.17); lo anterior explica por que la variable concentración de H₂ presenta limitaciones para la clasificación de estados estacionarios con el sustrato tipo hidratos de carbono.

Clasificación con dos variables

Al evaluar las 11 variables estudiadas por parejas resultan 55 combinaciones; las Tablas 4.5 y 4.7 presentan los porcentajes de acierto en la clasificación para las 55 combinaciones por parejas para los dos sustratos estudiados. En ambas tablas se resaltan en negrilla las combinaciones que obtienen un porcentaje de acierto mayor del 95%.

Para el sustrato tipo carbohidratos se identifican 22 combinaciones de dos variables que clasifican los diferentes estados estacionarios con un porcentaje de acierto mayor del 95%. Solo la combinación %CH₄- AP clasifica el 100 % de los estados estacionarios.

Tabla 4.5. Porcentaje de acierto de clasificación con todas las variables estudiadas por parejas para el sustrato tipo hidratos de carbono; resaltando en negrilla combinaciones con acierto de clasificación mayor del 95%.

Pcabeza											
94,2	%CH ₄										
89,6	87,2	H ₂									
93,4	96,5	90,6	QBiogas								
94,2	96,0	91,4	93,7	QCH ₄							
96,1	94,7	91,6	97,2	94,9	TOCe						
98,5	99,0	95,3	99,3	99,7	94,5	TICe					
90,5	80,1	75,7	92,9	94,4	94,4	97,4	TOCs				
98,5	93,4	78,0	98,8	98,8	92,6	86,1	87,2	pHs			
91,0	85,6	83,2	94,8	95,5	94,9	97,5	81,3	85,3	AGV		
98,9	100	92,9	99,3	98,2	93,6	95,9	99,1	87,8	99,2	AP	

En una primera aproximación cualquiera de las 22 combinaciones que ofrecen un acierto en la clasificación por encima del 95% se podría utilizar en la identificación del estado del proceso para el sustrato tipo carbohidratos.

Recordando que las variables Pcabeza y QBiogas son redundantes (lo cual se expresa en la simetría que presentan al relacionarse con las otras variables); podemos eliminar una de ellas sin perder información relevante; por lo tanto eliminando la variable Pcabeza (asumiendo que usualmente se monitoriza el caudal de biogás en las depuradoras industriales) se reduce el conjunto de combinaciones a 18.

La medición de TOC/TIC *on-line* rara vez se implementa en depuradoras industriales debido al alto coste de los analizadores. De otro lado las mediciones de AGV y AP pueden realizarse a escala industrial a un coste razonable utilizando analizadores disponibles en el mercado como el ANASENSE® (De Neve and Lievens, 2004; Ruiz et al., 2005b). De esta manera eliminando las variables TOC/TIC y manteniendo las variables AGV y AP; el conjunto se reduce a 9 combinaciones, las cuales se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6. Porcentaje de acierto de clasificación para las variables estudiadas por parejas tras el proceso de selección inicial para el sustrato tipo hidratos de carbono; resaltando en negrilla combinaciones con acierto de clasificación mayor del 95%.

%CH ₄					
96,5	QBiogas				
96,0	93,7	QCH ₄			
93,4	98,8	98,8	pHs		
85,6	94,8	95,5	85,3	AGV	
100	99,3	98,2	87,8	99,2	AP

La única pareja que clasifica con acierto del 100 % es la formada por %CH₄-AP, combinando por lo tanto una variable de la fase gas y una variable de la fase líquida. La medición del % CH₄ exige el análisis *on-line* de la composición del biogás. A continuación la pareja AGV-AP presenta el acierto en clasificación más alto con el 99,2 %; este resultado coincide con la propuesta de utilizar la relación de alcalinidades y la alcalinidad parcial como indicadores tempranos de perturbaciones en reactores anaerobios (Puñal *et al.*, 2001; Steyer *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista de instrumentación la pareja QBiogas – pH con acierto en la clasificación del 98,8 %, es la más atractiva debido al bajo coste de la medición *on-line* del caudal de biogás y el pH. Existen algunas experiencias exitosas de control utilizando solo estas dos variables, tanto en digestores de lodos (Björsson *et al.*, 2001) como en reactores anaerobios de alta tasa (Liu *et al.*, 2004a, 2004b, 2006).

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

Respecto a la clasificación por parejas en el sustrato tipo proteína, presentado en la Tabla 4.7. Solo 3 combinaciones por parejas logran clasificar con porcentaje de acierto mayor del 95%; son ellas: TOCe-TICe, TICe-%CH₄ y Pcabeza-AP. Tal como se mencionó anteriormente la monitorización *on-line* de TIC/TOC es costosa y rara vez se realiza en depuradoras industriales; por lo tanto solo la pareja Pcabeza-AP presenta un porcentaje de acierto adecuado.

Tabla 4.7. Porcentaje de acierto de clasificación con todas las variables estudiadas por parejas para el sustrato tipo proteína; resaltando en negrilla combinaciones con acierto de clasificación mayor del 95%.

Pcabeza												
72,2	%CH ₄											
67,5	77,3	H ₂										
62,1	79,2	62,7	QBiogas									
76,8	78,0	63,8	78,9	QCH ₄								
88,5	75,8	78,2	88,2	89,0	TOCe							
94,6	95,5	87,2	93,7	92,6	98,1	TICe						
86,7	73,4	85,6	91,5	90,9	83,4	93,9	TOCs					
90,3	86,0	83,7	87,8	88,3	85,8	88,4	75,9	pHs				
82,0	60,4	78,5	89,2	89,6	80,8	91,5	77,3	85,3	AGV			
98,1	83,7	80,9	94,3	92,8	87,6	87,5	85,8	75,9	90,9	AP		

Recordando que las variables Pcabeza y Qbiogás están altamente correlacionadas, se observa en la Tabla 4.7 que la pareja Qbiogás-AP con 94,3 % de acierto podría ser una alternativa en caso de no contar con medición de la presión en la cabeza del reactor (Pcabeza). En forma similar al comportamiento con el sustrato tipo hidratos de carbono, para el sustrato tipo proteína se presenta buena clasificación para las parejas QBiogas- AP, QCH₄- AP y AGV-AP con poder de clasificación entre el 90 y el 95%.

Clasificación con tres variables para el sustrato tipo proteína

Teniendo en cuenta el bajo poder de clasificación presentado por las parejas de variables en el sustrato tipo proteína se procedió a evaluar combinaciones de tres variables. La Tabla 4.8 muestra los resultados para la clasificación utilizando tres variables con aciertos de clasificación por encima del 95%.

Los resultados se presentan en dos grupos. El primer grupo muestra las combinaciones de las variables que presentaron individualmente mayor poder de clasificación (TOCe, TICe, TOCs, AP y QCH₄); este grupo tiene la limitación de involucrar variables que requieren la monitorización on-line de TIC/TOC. El segundo grupo presenta combinaciones solo de variables de salida del proceso (Pcabeza, QBiogas, QCH₄, H₂, AP y AGV); en dicho grupo solo las combinaciones AGV-AP-Pcabeza, AGV-AP-QBiogas y AGV-AP-QCH₄ tienen un poder de clasificación que supera el 95%.

Tabla 4.8. Clasificación utilizando combinaciones de tres variables para el sustrato tipo proteína, se presentan combinaciones con acierto mayor del 95%

Grupo	Combinación de 3 variables	% de acierto
Combinaciones de variables que mejor clasifican individualmente	TICe - TOCe - TOCs	99,4
	TICe - TOCe - AP	99,0
	TICe - TOCs - QCH ₄	98,5
	TICe - TOCe - QCH ₄	97,7
	TICe - AP - TOCs	97,4
	AP - TOCs - QCH ₄	96,9
	TOCe - AP - QCH ₄	95,8
Combinaciones de variables que caracterizan la salida del proceso	AP - AGV - Pcabeza	97,7
	AP - AGV - QCH ₄	96,5
	AP - AGV - QBiogas	96,4

De nuevo si se tiene en cuenta que las variables Pcabeza y QBiogas están altamente correlacionadas se pueden definir las combinaciones AGV-AP-QBiogas y AGV-AP-QCH₄ como las más adecuadas. Teniendo en cuenta el costo de la instrumentación, la combinación AGV-AP-QBiogas es la más indicada al no requerir en análisis *on-line* de la composición del biogas.

4.3.3. Selección de variables en estados dinámicos

Simulación previa de pulsos y escalones

Utilizando las ecuaciones 4-5 y 4-6 y los datos del primer estado estacionario posterior al arranque con cambio de sustrato, se estimó el tiempo de retención de sólidos (TRS) en el reactor piloto para cada sustrato tipo. En la Tabla 4.9 se presentan los datos utilizados en dicho cálculo.

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

Los TRS obtenidos son 55,6 y 161 días para dextrina y proteína hidrolizada respectivamente. Estos resultados concuerdan con los rendimientos reportados para condiciones mesofílicas, en g de biomasa por g de DQO consumida de 0,35 y 0,20 para los sustratos tipo carbohidratos y proteína respectivamente (Speece, 1996). El sustrato tipo carbohidratos al contener mayor energía disponible, genera mayor crecimiento de biomasa y por ende un TRS menor.

Tabla 4.9. Cálculo del tiempo de retención de sólidos (TRS) para los sustratos carbohidratos (dextrina) y proteína.

Agua residual tipo	Contenido promedio de sólidos suspendidos volátiles en el reactor - X_{total} (kg)	Salida promedio de sólidos suspendidos volátiles en el efluente - $\Delta X/\Delta t$ (kg·d ⁻¹)	Tiempo promedio de retención de sólidos - TRS (d)
Carbohidratos	17,8	0,320	55,6
Proteína	15,7	0,115	136

En la Figura 4.10 se presentan los resultados obtenidos por simulación con ADM1 para un cambio en la VCO de 5 a 45 kg DQO·m⁻³·d⁻¹ con una duración del pulso de 2,4 horas; puede observarse tanto en las variables de la fase gas como en las de la fase líquida un cambio apreciable sin desestabilizar el proceso. De igual manera en la Figura 4.11 se muestran los resultados de la simulación al realizar una perturbación en forma de escalón aumentando la VCO de 4,5 a 6,8 kg DQO·m⁻³·d⁻¹; las variables evaluadas tanto para la fase gas como la fase líquida muestran una magnitud de cambio apreciable.

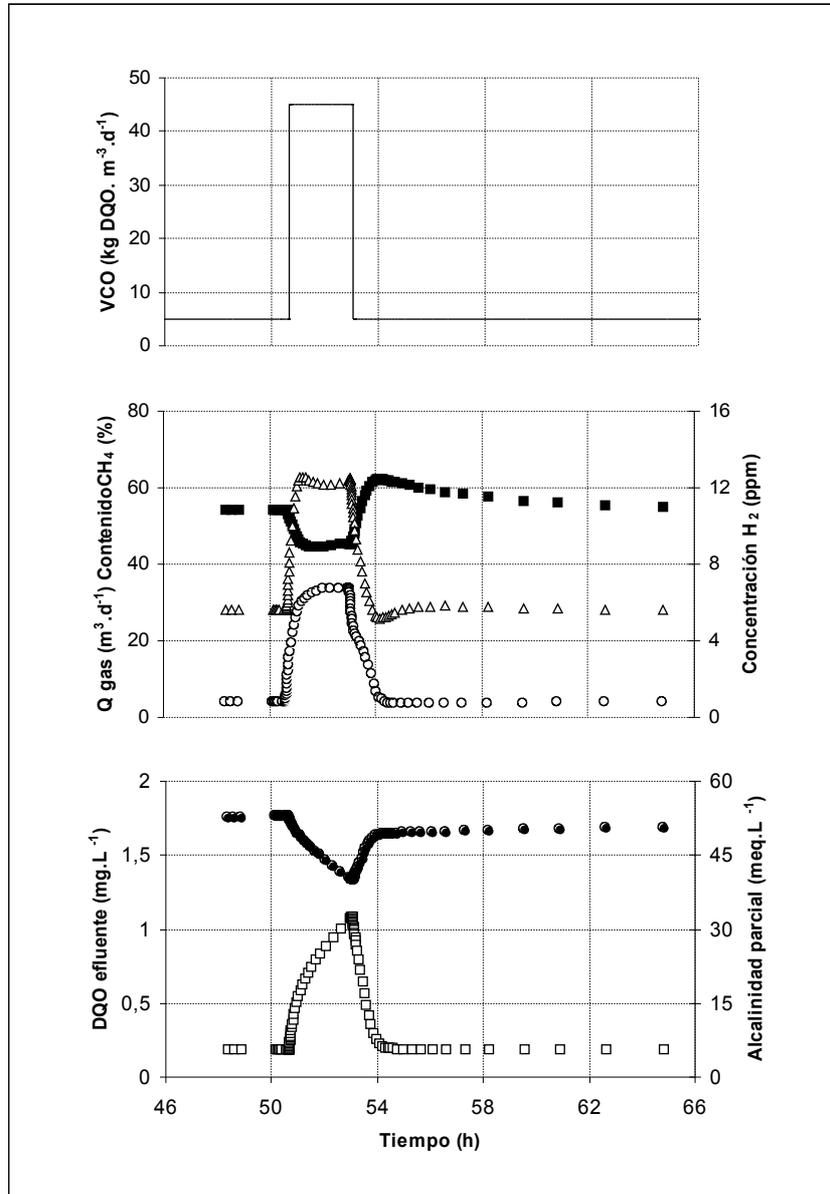


Figura 4.10. Simulación de un pulso para sustrato tipo carbohidratos: VCO (—), caudal de gas (O), % de CH₄ (■), concentración de H₂ (Δ), concentración de DQO salida (□), alcalinidad parcial (●).

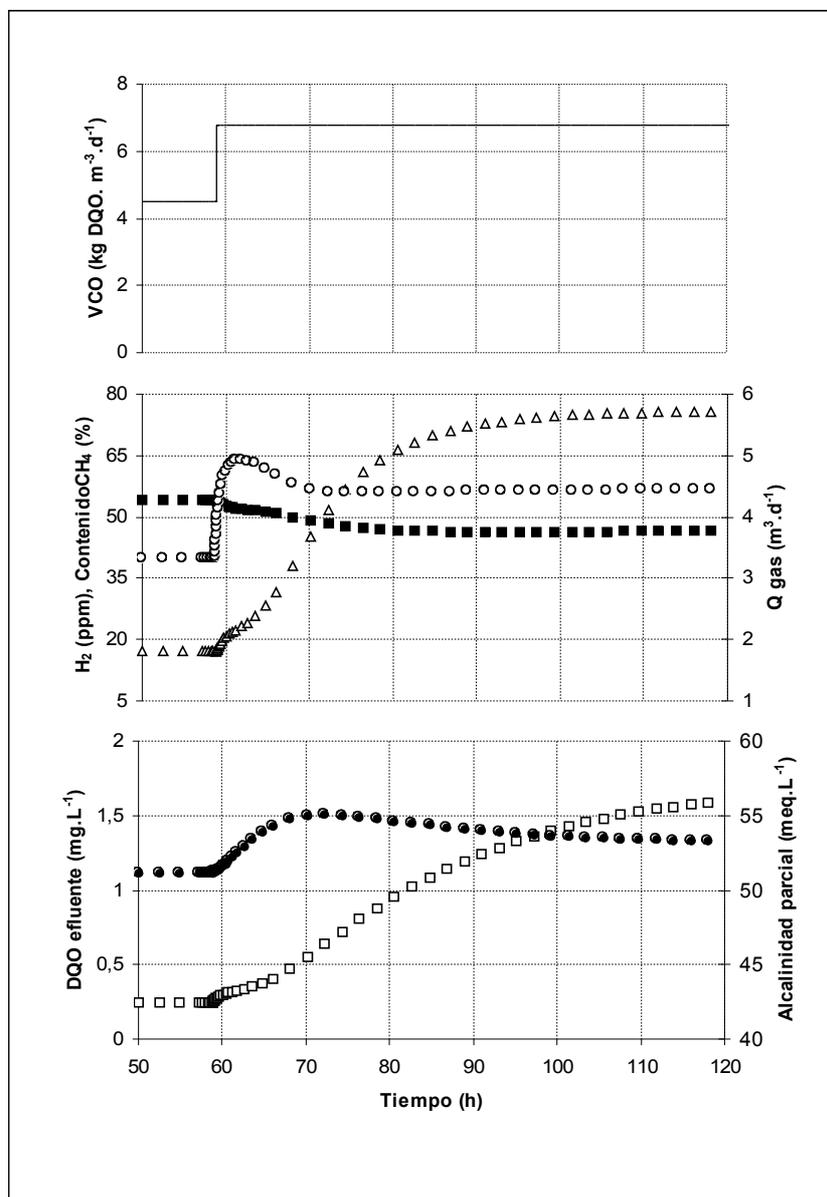


Figura 4.11. Simulación de un escalón para sustrato tipo carbohidratos: VCO (—), caudal de gas (○), % de CH₄ (■), concentración de H₂ (△), concentración de DQO salida (□), alcalinidad parcial (●).

Cambios en la VCO utilizados en la experimentación

Ayudados en la simulación de las perturbaciones en forma de pulso y escalón, se definieron en forma aproximada las diferentes VCO a aplicar en la realización de los experimentos; las VCO aplicadas finalmente sufrieron variaciones debido a la dinámica de operación de la planta (cambios en la biomasa, fallos en equipos y sensores). En las Figuras 4.12 y 4.13 se presentan para ambos sustratos los cambios de VCO finalmente utilizados en la experimentación.

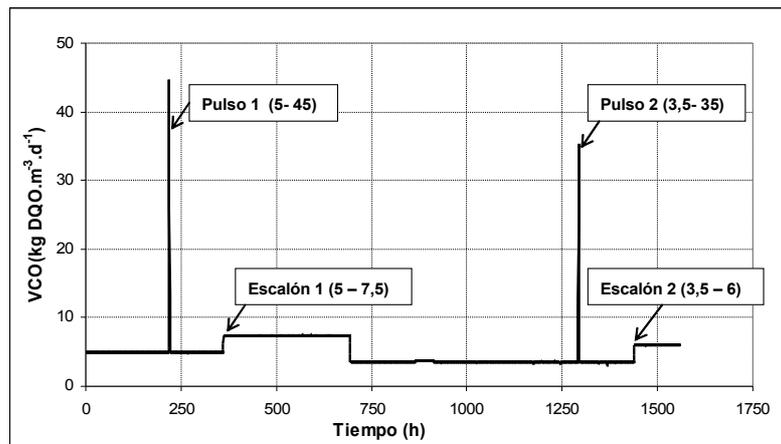


Figura 4.12. Evolución de la velocidad de carga orgánica (VCO) en los experimentos con el agua residual tipo carbohidratos.

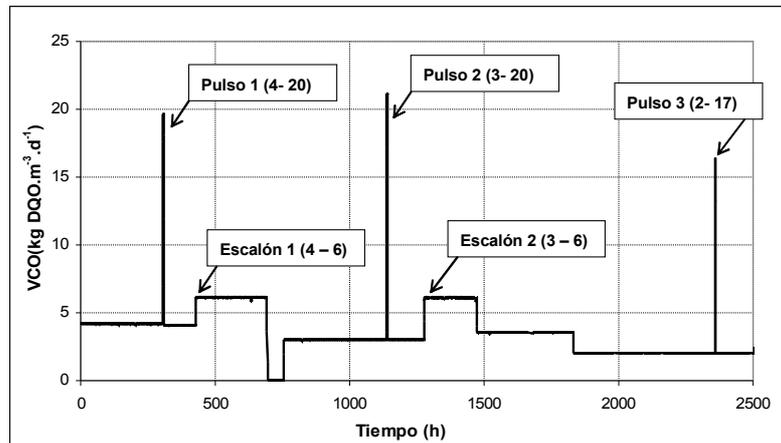


Figura 4.13. Evolución de la velocidad de carga orgánica (VCO) en los experimentos con el agua residual tipo proteína.

Comportamiento hidráulico

Las Figuras 4.14 y 4.15 presentan los resultados de las DTR para los dos sustratos (hidratos de carbono y proteína) en forma de curva normalizada de la concentración adimensional del trazador (C_φ) frente al tiempo medio adimensional (φ). Con el sustrato tipo carbohidratos se realizó un experimento de DTR sobre el día 300 de operación cuando se operaba con un tiempo de retención hidráulico de 24 horas, una VCO de $3,4 \text{ kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ y una producción de biogás de $77 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. Para el sustrato proteína hidrolizada se realizó la DTR en condiciones normales de operación con un tiempo de retención hidráulico de 24 horas, una VCO de $2,5 \text{ kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ y una producción de biogás de $60 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. En ambos casos se comparan las respuestas con el comportamiento de un tanque de mezcla completa (1 CSTR) y dos tanques de mezcla completa en serie (2 CSTR).

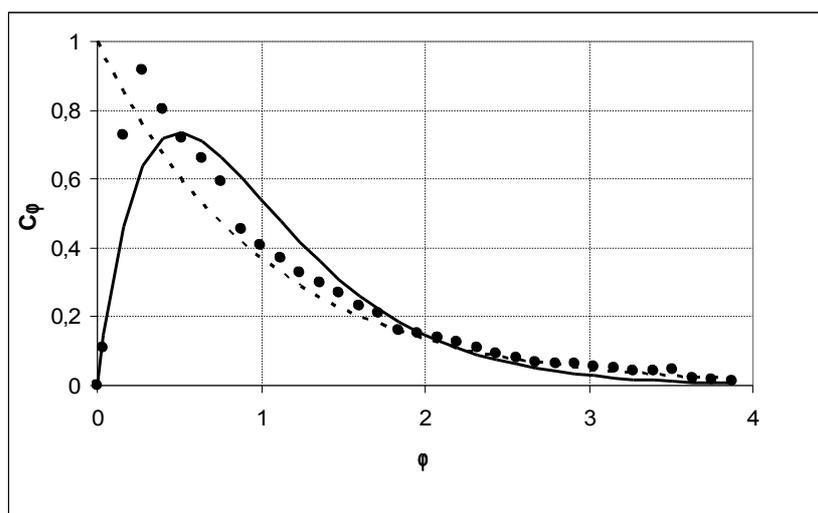


Figura 4.14. Curva de DTR para el sustrato hidratos de carbono; datos experimentales (●), 1 CSTR (--) y 2 CSTR en serie (—). Operando a caudal de alimentación de $45,8 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, caudal de recirculación de $200 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, TRH teórico de 24 h. El TRH calculado es de 24,9 h, el $Q_{\text{Biogás}}$ de $77 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ y la configuración resultante es de 1,55 CSTR en serie.

A partir de los experimentos con trazador que permiten obtener las curvas DTR, es posible conocer la hidrodinámica a nivel macroscópico de los reactores. De esta forma se puede tener una idea del tiempo de respuesta de la fase líquida en estos equipos. Se puede entonces decir, de manera aproximada, que el tiempo de respuesta es el tiempo transcurrido entre la inyección del trazador y la presencia de la concentración máxima de trazador en el efluente del reactor. Los tiempos de

respuesta encontrados son 5,5 h y 7 h para los sustratos tipo carbohidratos y tipo proteína, respectivamente. En las perturbaciones tipo impulso; al generarse una cantidad importante de biogás; el comportamiento hidráulico del sistema tenderá a acercarse a un reactor de mezcla completa y por lo tanto el tiempo de respuesta de la fase líquida será menor al encontrado en estado estacionario.

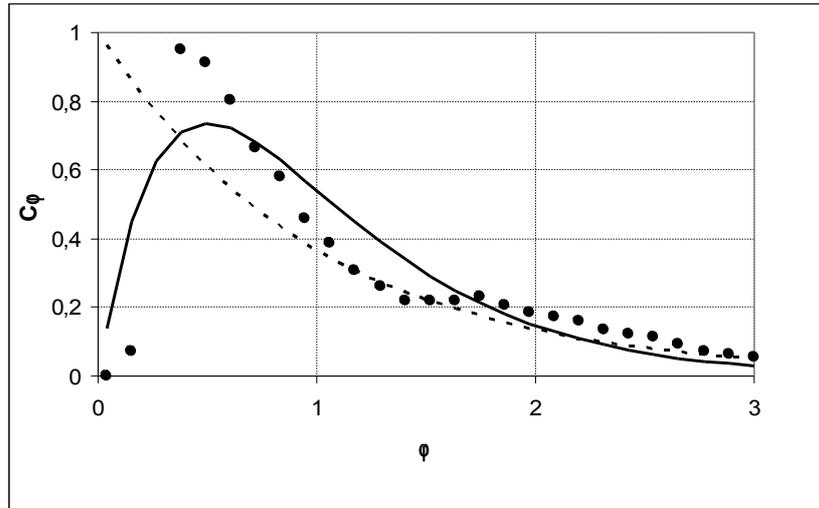


Figura 4.15. Curva de DTR para el sustrato proteína; datos experimentales (\bullet), 1 CSTR (- -) y 2 CSTR en serie (-). Operando a caudal de alimentación de $45,8 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, caudal de recirculación de $200 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, TRH teórico de 24 h. El TRH calculado es de 26,4 h, el QBiogás de $60 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ y la configuración resultante es de 2,08 CSTR en serie.

Evaluación de variables para el sustrato tipo hidratos de carbono

De acuerdo con lo expuesto en el apartado 4.2.4 se analizaron las perturbaciones tipo pulso y escalón utilizando los parámetros tiempo de retardo al máximo valor en los pulsos y tiempo de retardo a respuesta estable en los escalones, nivel de excitación y pendiente normalizada. Adicionalmente en las perturbaciones tipo escalón se analizó el tiempo de retardo a pendiente máxima. Las Figuras 4.16 y 4.17 muestran a manera de ejemplo la evolución de las variables en la fase gas y en la fase líquida para el sustrato tipo carbohidratos durante el pulso con cambio en la VCO de 5 a $45 \text{ kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. En ambas figuras se puede observar la respuesta inmediata de los indicadores de la fase gas y fase líquida ante la perturbación tipo pulso; no se detecta retardo entre el inicio del pulso y la respuesta de los diferentes indicadores. Este hecho se relaciona con el sustrato tipo carbohidratos (dextrina) de fácil degradación; utilizado en estos experimentos.

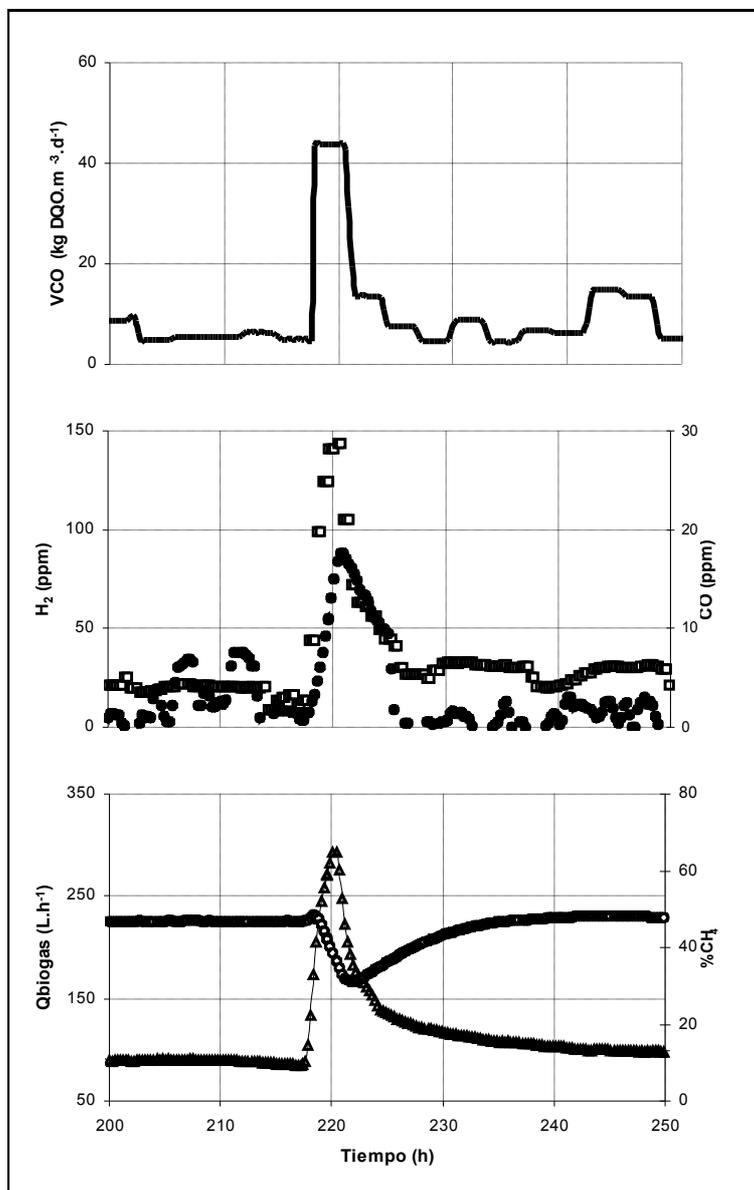


Figura 4.16. Evolución de las variables en la fase gas para el pulso VCO 5–45 con sustrato tipo carbohidratos: VCO (—), H₂ (□), CO (●), Qbiogás (-△-) y %CH₄ (○).

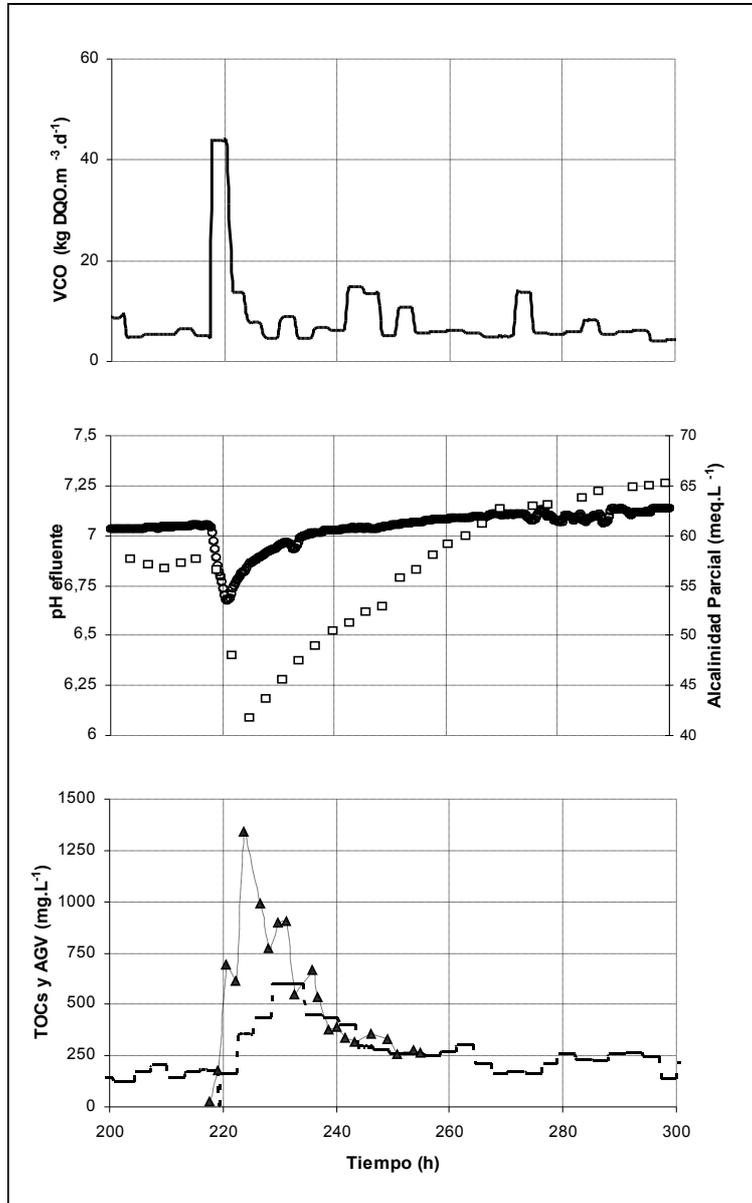


Figura 4.17. Evolución de las variables en fase líquida para el pulso VCO 5-45 con sustrato tipo carbohidratos: VCO (-), pHs (O), Alcalinidad parcial (□), TOCs (- -) y AGV(-▲-).

Las Tablas 4.10 y 4.11 presentan para el sustrato tipo carbohidratos los valores de los parámetros: tiempo a máximo valor para las perturbaciones tipo pulso o tiempo a valor estable para las perturbaciones tipo escalón; nivel de excitación y

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

pendiente normalizada de las diferentes variables monitorizadas para los pulsos y escalones respectivamente. La magnitud de cambio en los diferentes indicadores es mucho mayor en los pulsos, debido a su dependencia directa del cambio en la VCO.

Tabla 4.10. Características de la respuesta de las diferentes variables a la perturbación tipo pulso en el sustrato tipo carbohidratos.

Fase	Variable	Pulso 1 (VCO 5-45)			Pulso 2 (VCO 3,5-35)		
		Tiempo hasta respuesta máxima (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)	Tiempo hasta respuesta máxima (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)
Gas	%CH ₄	4,0	0,3	0,10	5,2	0,2	0,06
	H ₂	2,8	4,6	1,74	1,7	0,8	0,25
	CO	3,0	9,0	3,10	4,7	11,1	3,34
	Qbiogás	2,5	2,2	0,84	2,6	1,8	0,66
	QCH ₄	2,0	1,6	0,78	2,4	1,5	0,54
Líquido	TOCs	12	2,2	0,20	13	1,4	0,10
	pHs	3,3	0,1	0,02	3,2	0,1	0,01
	AGV	9,0	6,6	1,27	7,5	11,7	1,36
	AP	6,0	0,3	0,04	6,0	0,2	0,03

En el sustrato tipo carbohidratos, el indicador que presenta mayor valor del nivel de excitación como respuesta a las perturbaciones tipo pulso, es la concentración de CO que se incrementa 9 y 11 veces respectivamente para los dos pulsos estudiados (ver Tabla 4.10). Este comportamiento concuerda con lo reportado por otros investigadores (Hickey and Switzenbaum, 1990; Ruiz *et al.*, 2002). La pendiente normalizada para el indicador concentración de CO es muy similar en ambos pulsos, tomando un valor cercano a 3.

El indicador concentración de H₂ muestra un comportamiento diferente en cada pulso, en el primer pulso la pendiente normalizada es de 1,74, mientras que en el segundo pulso dicho parámetro toma el valor de 0,25. Esta irregularidad en la respuesta de la concentración de H₂ frente a perturbaciones similares; se debe al impacto que tiene el grado de acidificación del sustrato en dicho indicador (Guwy *et al.*, 1997). Por esta razón el valor tanto del nivel de excitación como de la pendiente normalizada es mucho más bajo para el segundo pulso debido a que 24 horas antes de realizar el pulso se comenzó a utilizar sustrato fresco y el aumento de la concentración de H₂ en la fase gas por acidificación del sustrato enmascaró el efecto del pulso.

En la fase líquida los AGV son el indicador que presenta el mayor valor de pendiente normalizada (por encima de la variable TOCs); superando inclusive la presentada por los parámetros de la fase gas: QBiogás y QCH₄. Sin embargo el tiempo hasta respuesta máxima para los AGV, es aproximadamente 3 veces el tiempo hasta respuesta máxima que muestran los indicadores de la fase gas.

Capítulo 4

Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Moletta (1989); Mathiot *et al.* (1992); Ahring *et al.* (1995) y Huang *et al.* (2000). El indicador pHs muestra el valor más bajo en la pendiente normalizada, confirmando que dicho indicador no tiene mayor utilidad en la detección temprana de sobrecargas orgánicas.

Tabla 4.11. Características de la respuesta de las diferentes variables a la perturbación tipo escalón en el sustrato tipo carbohidratos.

Fase	Variable	Escalón 1 (VCO 5-7,5)			Escalón 2 (VCO 3,5-6)		
		Tiempo hasta respuesta estable (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)	Tiempo hasta respuesta estable (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)
Gas	%CH ₄	14	0,1	0,01	11	0,2	0,02
	H ₂	10	2,9	0,70	5	1	0,24
	CO	*	*	*	*	*	*
	Qbiogás	13	0,4	0,09	8	0,5	0,05
	QCH ₄	8	0,4	0,08	5	0,3	0,05
Líquido	TOCs	109	1,8	0,02	68	1,3	0,02
	pHs	**	**	**	50	0,05	0,001
	AGV	105	6,1	0,05	67	4,9	0,10
	AP	66	0,07	0,01	52	0,8	0,02

* No detectado; ** Oscilaciones en el parámetro.

En las perturbaciones tipo escalón no se detectan cambios en la concentración del CO en fase gaseosa; confirmando que el indicador concentración de CO solo es válido para sobrecargas orgánicas severas (Ruiz *et al.*, 2002). En este caso la concentración de H₂ se muestra como el mejor indicador con la mayor pendiente normalizada y el menor tiempo a concentración estable. Del resto de los indicadores se resalta el comportamiento similar en referencia a pendiente normalizada de QBiogás, QCH₄ y AGV; sin embargo los AGV presentan un tiempo a respuesta estable aproximadamente 10 veces mayor que los indicadores de la fase gas.

Adicionalmente para el sustrato tipo carbohidratos se evaluó en los escalones el parámetro tiempo hasta pendiente máxima utilizando la correlación cruzada entre la VCO y las variables en estudio; los resultados se presentan en la Tabla 4.12. La Figura 4.18 muestra un ejemplo del análisis de tiempo hasta pendiente máxima realizado para el indicador AP en el escalón con cambio de VCO de 3,5 a 6 kg DQO·m⁻³·d⁻¹ utilizando sustrato tipo carbohidratos.

Puede observarse en la Figura 4.18, que el mayor factor de correlación se presenta en el tiempo de retardo 6; lo que indica que el cambio en la VCO genera el mayor cambio en la AP a los 6 retardos. El valor del tiempo de retardo resulta de multiplicar el número de retardos por el tiempo de refrescamiento del dato (período en que se realiza una nueva medida de la variable); para la AP se realiza un nuevo análisis cada 3 horas. Por lo tanto la influencia máxima del cambio en la VCO se presenta para la AP con un retardo de 18 horas.

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

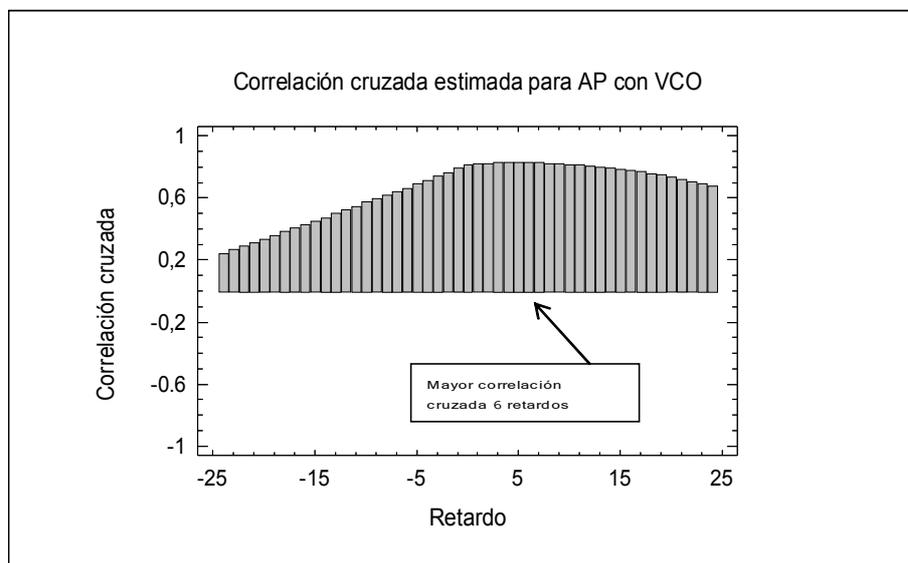


Figura 4.18. Ejemplo del análisis de tiempo hasta pendiente máxima por correlación cruzada entre la VCO y cada variable dependiente, en este caso la AP efluente.

En la Tabla 4.12 se observa que los menores tiempos hasta pendiente máxima se presentan para los indicadores de la fase gas: H₂, QCH₄ y QBiogas; los cuales muestran una respuesta casi inmediata a partir del inicio de la perturbación. En las variables de la fase líquida se presenta un mayor valor del parámetro tiempo hasta pendiente máxima; mostrando diferencias importantes en el valor de dicho parámetro para las dos perturbaciones tipo escalón. Dichas diferencias posiblemente están relacionadas con los rangos de VCO aplicadas; presentando mayor velocidad de respuesta para el mayor rango de VCO aplicada.

Tabla 4.12. Valores del parámetro tiempo hasta pendiente máxima para cada variable respuesta estudiada en el sustrato tipo carbohidratos.

Fase	Variable	Escalón 1 (VCO 5-7,5)		Escalón 2 (VCO 3,5-6)	
		Retardos	Tiempo (h)	Retardos	Tiempo (h)
Gas	%CH ₄	10	2,5	11	2,75
	H ₂	0*	0	1*	0,5
	QBiogas	2	0,5	1	0,25
	QCH ₄	1	0,25	0	0
Líquido	TOCs	1**	3	8**	24
	AGV	1**	3	6**	18
	AP	2**	6	6**	18

*Retardo para H₂ de 0,5 h; ** Retardo para DOCs, AP y AGV de 3 h; el resto de las variables con retardo de 0,25 h.

Capítulo 4

Evaluación de variables para el sustrato tipo proteína

En las Tablas 4.13 y 4.14 se muestran los resultados de los diferentes parámetros para el sustrato tipo proteína al realizar las sobrecargas orgánicas en forma de pulso y escalón. Se estudiaron 3 perturbaciones en forma de pulso y dos en forma de escalón. En las perturbaciones tipo pulso tanto la variable pH como la alcalinidad parcial aumentan su valor a partir del inicio del pulso, esto se debe a la conversión del nitrógeno orgánico presente en la proteína a amonio; conversión que aumenta la alcalinidad parcial del sistema.

Tabla 4.13. Características de la respuesta de las diferentes variables a la perturbación tipo pulso en el sustrato tipo proteína.

Fase	Variable	Pulso 1 (VCO 4-20)			Pulso 2 (VCO 3-20)		
		Tiempo hasta respuesta máxima (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)	Tiempo hasta respuesta máxima (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)
Gas	%CH ₄	6,7	0,1	0,02	7,0	0,1	0,02
	H ₂	2,9	0,3	0,31	2,3	0,5	0,25
	CO	*	*	*	*	*	*
	QBiogás	3,4	0,5	0,15	2,4	0,9	0,43
	QCH ₄	3,1	0,4	0,28	2,3	0,9	0,49
Líquido	TOCs	10,0	1,6	0,36	6,3	2,1	0,32
	pHs	13,7	0,02	0,003	12,6	0,03	0,002
	AGV	9,4	6,8	0,75	11,0	4,8	0,78
	AP	9,9	0,3	0,03	14,3	0,1	0,01

* No detectado.

Para el sustrato tipo proteína no se detectan cambios en la concentración de CO en fase gas durante las perturbaciones tipo pulso y escalón. El otro hecho relevante es que los AGV presentan la mayor pendiente normalizada, superando inclusive a los indicadores de la fase gas como H₂, QBiogás y QCH₄ en dicho parámetro. La limitación que muestran los AGV frente a los indicadores de la fase gas es un tiempo hasta respuesta máxima de 3 a 5 veces mayor; lo cual es consistente en los tres pulsos estudiados.

Los indicadores H₂, QBiogás y QCH₄ muestran valores muy similares en los parámetros tiempo hasta respuesta máxima y pendiente normalizada; por lo tanto cualquiera de los tres indicadores puede ser utilizado en la detección de sobrecargas orgánicas con el sustrato tipo proteína. La medición *on-line* del indicador QBiogás es la más sencilla y de menor coste, por lo tanto dicho indicador se presenta como la mejor opción.

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

Continuación Tabla 4.13. Características de la respuesta de las diferentes variables a la perturbación tipo pulso en el sustrato tipo proteína.

Fase	Variable	Pulso 3 (VCO 2-17)		
		Tiempo hasta respuesta máxima (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)
Gas	%CH ₄	8,8	0,1	0,02
	H ₂	2,5	0,3	0,16
	CO	*	*	*
	QBiogás	2,3	0,6	0,29
	QCH ₄	2,3	0,6	0,29
Líquido	TOCs	10,6	2,4	0,34
	pHs	19,6	0,03	0,002
	AGV	12,5	7,2	0,89
	AP	11,6	0,2	0,03

* No detectado.

Las variables %CH₄ y pHs muestran valores muy bajos en el parámetro pendiente normalizada, por lo tanto no se consideran adecuadas para identificar en forma temprana una perturbación en la VCO tipo pulso.

En las perturbaciones tipo escalón la variable H₂ presenta la mayor pendiente normalizada y el menor tiempo hasta respuesta estable. Los valores de pendiente normalizada en las variables QBiogás y QCH₄ son similares al valor mostrado por los AGV en dicho parámetro; sin embargo la variable AGV tiene la limitación de presentar un tiempo hasta respuesta estable entre 8 y 12 veces mayor que el presentado por QBiogás y QCH₄.

Tabla 4.14. Características de la respuesta de las diferentes variables a la perturbación tipo escalón en el sustrato tipo proteína

Fase	Variable	Escalón 1 (VCO 4-6)			Escalón 2 (VCO 3-6)		
		Tiempo hasta respuesta estable (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)	Tiempo hasta respuesta estable (h)	Nivel de excitación (-)	Pendiente Normalizada (h ⁻¹)
Gas	%CH ₄	25	0,1	0,01	29	0,1	0,01
	H ₂	3	0,2	0,11	2	0,3	0,21
	CO	*	*	*	*	*	*
	QBiogás	10	0,4	0,04	7	1,0	0,06
	QCH ₄	10	0,4	0,06	7	0,9	0,12
Líquido	TOCs	50	4,1	0,08	50	3,0	0,04
	pHs	29	0,01	0,001	6	0,02	0,001
	AGV	83	5,4	0,07	93	11,4	0,11
	AP	44	0,4	0,01	28	0,5	0,02

* No detectado.

Capítulo 4

Las variables %CH₄, AP y pHs muestran valores muy bajos para el parámetro pendiente normalizada, lo que indica que dichas variables presentan en las perturbaciones tipo escalón una dinámica de respuesta lenta y por lo tanto no son variables adecuadas para ser utilizadas en la predicción de perturbaciones.

Para el sustrato tipo proteína también se realizó en las perturbaciones tipo escalón la evaluación del parámetro tiempo hasta pendiente máxima, para lo cual se utilizó la correlación cruzada entre la VCO y las variables en estudio; los resultados se muestran en la Tabla 4.15.

En ambos escalones las variables de la fase gas: H₂, QBiogas Y QCH₄ presentan los valores más bajos (entre 0 y 1 hora) para el parámetro tiempo hasta pendiente máxima. De otro lado en las variables de la fase líquida se presentan valores para este parámetro de 6 a 9 horas.

De acuerdo con lo anterior en una perturbación en la VCO tipo escalón se obtiene una velocidad de respuesta máxima (pendiente máxima) de forma casi inmediata en las variables de la fase gas (H₂, QBiogas y QCH₄); mientras que en las variables en la fase líquida (TOCs, AGV y AP) muestran un retardo de 6 a 9 horas.

Tabla 4.15. Valores del parámetro tiempo hasta pendiente máxima para cada variable respuesta estudiada en el sustrato tipo proteína.

Fase	Variable	Escalón 1 (VCO 4-6)		Escalón 2 (VCO 3-6)	
		Retardos	Tiempo (h)	Retardos	Tiempo (h)
Gas	%CH ₄	33	8,25	14	3,5
	H ₂	2*	1,0	0*	0
	QBiogas	3	0,75	0	0
	QCH ₄	4	1,0	0	0
Líquido	TOCs	3**	9	2**	6
	AGV	3**	9	3**	9
	AP	2**	6	3**	9

* Retardo para H₂ de 0,5 h; ** Retardo para TOCs , AP y AGV de 3 h; el resto de las variables con retardo de 0,25 h.

Evaluación de variables durante el choque térmico

Para el sustrato tipo proteína se estudió la respuesta de las variables monitorizadas durante la disminución de temperatura en el reactor de 37 a 25 °C; manteniendo la velocidad de carga orgánica en 4 kg DQO·m⁻³·d⁻¹. El experimento se realizó simulando el fallo del sistema de calentamiento de la línea de recirculación.

Esta perturbación se asemeja a un estímulo tipo escalón realizado en forma gradual (la temperatura disminuye lentamente debido a la inercia del sistema). La disminución de temperatura genera una disminución en la actividad de la biomasa y puede generar un desequilibrio entre el flujo de materia orgánica que entra al sistema y la capacidad de metanogenización de la biomasa (Mathiot *et al.*, 1992); con lo cual la concentración de AGV tiende a aumentar y potencialmente se puede

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

desestabilizar el sistema al agotarse la capacidad tampón y descender el valor del pH (Speece, 1996).

En las Figuras 4.19 y 4.20 se presenta la evolución de las variables de la fase gas y de la fase líquida durante la disminución de la temperatura en el reactor de 37 a 25 °C en aproximadamente 40 horas. En la Figura 4.19 se observa una disminución leve (aproximadamente 10 ppm) en la concentración de H₂ durante el enfriamiento del reactor; paralelamente el % CH₄ también disminuye levemente (3%). Ambos comportamientos difieren de lo reportado por Mathiot *et al.* (1992); quienes encontraron durante el enfriamiento de un filtro anaerobio de 35 a 25 °C: un leve aumento en la concentración de H₂ en fase gas, y el aumento en el %CH₄ y disminución del % CO₂ en fase gas; debido posiblemente al aumento de la disolución de CO₂ en la fase líquida .

Tanto el QBiogas como el QCH₄ disminuyen aproximadamente en 40 % con respecto a su valor antes del enfriamiento del reactor, este comportamiento es acorde con la disminución teórica de la actividad de la biomasa anaerobia evaluada con la ecuación 4.9 propuesta por Henze y Harremoes (1982) que predice una disminución en la actividad del 37%.

$$K_T = K_{35} \cdot \exp^{\theta \cdot (T - 35)} \quad (\text{Ec. 4.9})$$

Donde:

K_T : constante de actividad microbiológica a la temperatura T

K_{35} : constante de actividad microbiológica a 35 °C

θ : coeficiente de temperatura (0,1)

Con un retardo de aproximadamente 20 horas se presenta en la fase líquida el aumento en la concentración de TOCs y AGV, dichas variables duplican su valor inicial al finalizar el experimento. En forma paralela al aumento en la concentración de AGV se presenta la disminución importante en la alcalinidad parcial y la consecuente caída del valor del pHs de 6,9 a 6,5 debido a la acumulación de AGV y al consumo de la alcalinidad parcial disponible. Estos resultados concuerdan con lo observado por Cayless *et al.* (1989); quienes sugieren que la acumulación de AGV y la disminución en el % de CH₄ están relacionadas con la mayor sensibilidad de las poblaciones metanogénicas a la disminución de temperatura.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo; la respuesta del proceso frente a la disminución gradual de temperatura es similar a la respuesta frente a una inhibición. Ya que disminuye la actividad de la biomasa, cae la producción de metano y se produce acumulación de productos intermedios como los AGV.

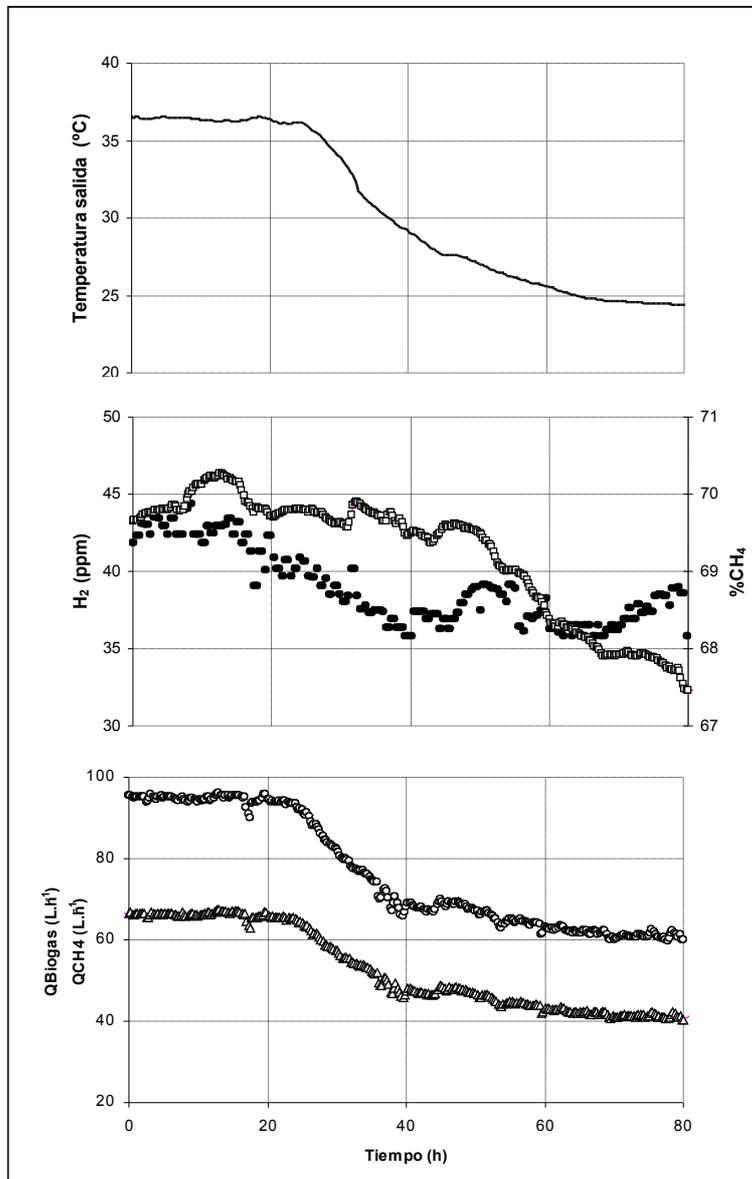


Figura 4.19. Evolución de los parámetros de la fase gas durante el choque térmico
 Temperatura de salida (-), %CH₄(□), H₂ (●), QCH₄ (△) y QBiogas(O)

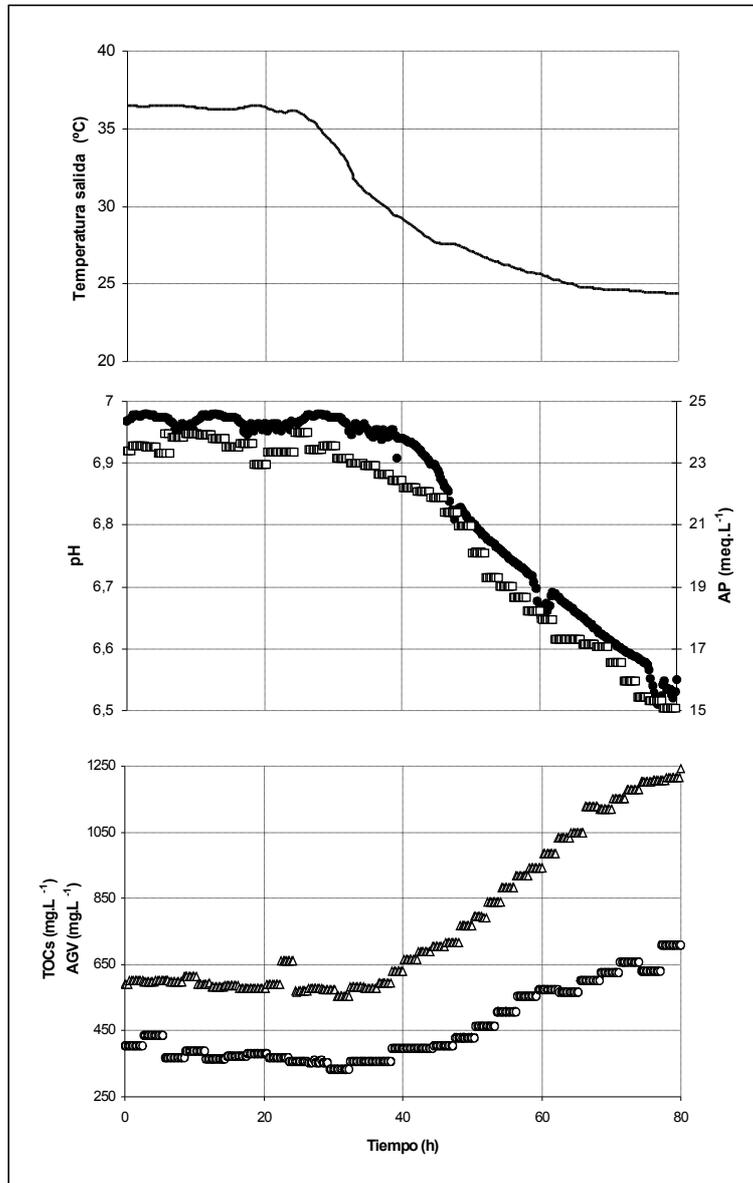


Figura 4.20. Evolución de los parámetros de la fase líquida durante el choque térmico Temperatura de salida (—), AP (□), pH (●), AGV (△) y TOCs (○).

4.3.4. Análisis conjunto

En la primera parte de este capítulo se realizó la evaluación del número mínimo de variables que permiten clasificar adecuadamente los diferentes estados estacionarios alcanzados durante la experimentación con dos sustratos típicos. En la Tabla 4.16 se presenta un resumen de las variables y combinaciones de variables con mejores resultados y mayor viabilidad de aplicación en la detección de estados estacionarios. De dicho resumen se puede concluir que son compatibles las variables y combinaciones de variables que mejor clasifican los estados estacionarios para ambos sustratos típicos y que dichas variables y combinaciones de las mismas están conformadas por la variable de la fase gas QBiogas y las variables de la fase líquida AGV y AP.

Tabla 4.16. Resumen de variables y combinaciones de variables seleccionadas para la detección de estados estacionarios para los sustratos tipo hidratos de carbono y proteína.

Condición	Sustrato tipo carbohidratos	Sustrato tipo proteína
Mejor clasificación utilizando variables por separado	QCH ₄	AP
	QBiogas	AGV
	AGV	QCH ₄
	AP	
Mejor clasificación utilizando combinaciones de dos variables	QCH ₄ - AP	QBiogas-AP
	QBiogas - AP	
	QCH ₄ - pHs	
	QBiogas - pHs	
	AGV - AP	
Mejor clasificación utilizando combinaciones de tres variables	QCH ₄ - AGV	
	No estudiado	AGV-AP-QCH ₄ AGV-AP-QBiogas

En la segunda parte se realizó el análisis y selección de las variables que indican en forma temprana y más adecuada la presencia de perturbaciones en la VCO del proceso. En este análisis se identifican diferencias en el comportamiento de las variables de la fase gas entre los dos sustratos estudiados y entre las perturbaciones tipo pulso y tipo escalón, un resumen de las variables seleccionadas se muestra en la Tabla 4.17. Para el sustrato tipo carbohidratos las mejores variables en la detección temprana de perturbaciones en la VCO tipo pulso, son las concentraciones de CO y H₂ en la fase gas; sin embargo la concentración de CO no muestra ninguna variación frente a las perturbaciones tipo escalón. En la fase líquida, el mejor indicador de perturbaciones tipo pulso son los AGV, con la limitación de presentar un tiempo de respuesta de 2 a 3 veces mayor que las variables H₂ y CO. Debe recordarse que en la detección de temprana de perturbaciones es de mayor utilidad la evaluación de las tasas de cambio relativo de las variables, por lo tanto es más adecuado calcular la pendiente normalizada de los

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

datos sobre una ventana que tomar solo el valor puntual de la variable.

Tabla 4.17. Variables seleccionadas en la detección de perturbaciones en la VCO para los sustratos tipo hidratos de carbono y proteína.

Condición	Sustrato tipo carbohidratos	Sustrato tipo proteína
Mejores indicadores en perturbaciones tipo pulso	H ₂	AGV
	CO	H ₂
	AGV	QCH ₄ QBiogas
Mejores indicadores en perturbaciones tipo escalón	H ₂	H ₂
	QBiogas	AGV
	QCH ₄	QCH ₄
	AGV	QBiogas

Para el sustrato tipo proteína, la concentración de CO en fase gas no presentan variaciones frente a las perturbaciones tipo pulso y escalón, por lo tanto se descarta su utilidad en la detección temprana de sobrecargas para dicho sustrato. En la fase gas las variables H₂ y QBiogas presentan el mejor comportamiento para el sustrato tipo proteína. De acuerdo con lo anterior es posible en los dos sustratos estudiados, compatibilizar las variables que permiten por un lado detectar los diferentes estados estacionarios y por el otro identificar en forma temprana las perturbaciones en la VCO.

En la Tabla 4.18 se presenta la propuesta del conjunto mínimo de variables que permite la diagnosis y control del proceso para los dos sustratos estudiados. En dicha tabla se muestran los diferentes niveles de instrumentación propuestos. La instrumentación básica se refiere a la instrumentación de bajo nivel y bajo coste que generalmente se instala en las depuradoras industriales. La instrumentación necesaria incluye las variables seleccionadas en este trabajo y por último la instrumentación conveniente incluye el análisis *on-line* del gas traza H₂, el cual permite la detección de sobrecargas orgánicas en ambos sustratos

Tabla 4.18. Selección de variables para la diagnosis y control del proceso de digestión anaerobia con sustratos tipo carbohidratos y tipo proteína.

Fase	Instrumentación básica	Instrumentación necesaria	Instrumentación conveniente
Gas		QBiogas	H ₂
Líquida	pH entrada pH salida T entrada T salida Q entrada Q recirculación	AGV AP	

4.4. Conclusiones

Se presentaron dos metodologías complementarias en la selección de los indicadores que permiten identificar el estado del proceso y la detección de perturbaciones operando con dos sustratos tipo.

Se comprobó la utilidad del análisis de componentes principales (PCA) en la reducción de la dimensión multivariable de un conjunto de datos de monitorización del proceso de digestión anaerobia; logrando retener más del 80% de la variabilidad del proceso con las dos primeras componentes principales. Así como la capacidad del análisis factorial discriminante (FDA) para clasificar adecuadamente los datos pertenecientes a diferentes estados estacionarios.

Utilizando una sola variable para la clasificación de los diferentes estados estacionarios se presentan diferencias relevantes entre los dos sustratos tipo. Para el sustrato tipo hidratos de carbono las variables QCH_4 y $QBiogas$ permiten aciertos por encima del 90 % en la clasificación, superando inclusive las variables que caracterizan la entrada al proceso (TOCe y TICe). Mientras que para el sustrato proteína la clasificación en los diferentes estados estacionarios es más deficiente cuando se utiliza una sola variable y solo las variables TOCe y TICe logran clasificaciones cercanas al 80%

Utilizando combinaciones de 2 variables para el sustrato tipo hidratos de carbono y 3 variables para el sustrato tipo proteína se encontró que las combinaciones que mejor clasifican los diferentes estados estacionarios para ambos sustratos tipo son: AGV – AP - QCH_4 y AGV – AP – $Qbiogas$.

Se identificó la pendiente normalizada como el parámetro clave en la detección de perturbaciones en la VCO, debido a que dicho parámetro representa la velocidad de respuesta del sistema frente a cambios en las características del residuo o cambios en las condiciones de operación del sistema. Por lo tanto para diagnóstico y control del proceso es más conveniente realizar la evaluación del cambio relativo del valor de las variables con el tiempo que utilizar el valor absoluto de la variable.

Se encontró que la concentración de CO tiene una utilidad muy reducida en la detección de perturbaciones, utilizando dicha variable solo fue posible detectar perturbaciones tipo pulso en el sustrato tipo hidratos de carbono.

La concentración de H_2 es una variable que permite la detección de perturbaciones en la VCO (tipo pulso y escalón) en ambos sustratos estudiados. Sin embargo se debe tener en cuenta que para el sustrato tipo carbohidratos la concentración de H_2 depende directamente del grado de acidificación del sustrato al ingresar al reactor, este hecho puede generar un diagnóstico errado del estado del proceso.

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

Para ambos sustratos estudiados las variables: QCH_4 , $QBiogas$ y AGV son adecuadas en la detección de perturbaciones en la VCO.

De acuerdo con los resultados de este trabajo y considerando los niveles de complejidad y coste de monitorización se proponen tres niveles de instrumentación:

- instrumentación básica (pH, temperatura y caudales): pHmetros; sensores de temperatura y caudalímetros.
- instrumentación necesaria ($QBiogas$, AGV y AP): analizador de H_2 en fase gas; caudalímetro y analizador titrimétrico de AGV y AP.
- Instrumentación conveniente (H_2): analizador de hidrógeno en fase gas.

4.5. Referencias

- Ahring B.K., Sanderberg M. and Angelidaki I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(3), 559-565.
- Anderson G.K. and Yang G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research*, 64(1), 53-59.
- Archer D.B., Hilton M.G., Adams P. and Wiecko H. (1986). Hydrogen as a process control index in a pilot scale anaerobic digester. *Biotechnology Letters*, 8(3), 197-202.
- Bae J. and McCarty P.L. (1993). Variation of carbon monoxide production during methane fermentation of glucose. *Water Envirom. Res*, 65 (7): 890-898.
- Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S.V., Pavlostathis S.G., Rozzi A., Sanders W.T.M., Siegrist H. and Vavilin V.A (2002). *Anaerobic Digestion Model No. 1*. IWA Scientific and Technical Report No. 13. IWA Publishing, London.
- Björnsson L., Murto M. and Mattiasson B. (2000). Evaluation of parameters for monitoring anaerobic co-digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 844-849.
- Björnsson L., Murto M., Jantsch T.G. and Mattiasson B. (2001). Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion. *Water Research*, 35(12), 2833-2840.
- Brown P.R. and Rhinehart R.R. (2000). Demonstration of a method for automated steady-state identification in multivariable systems. *Hydrocarbon Processing*, 79(9), 79-83.
- Cao S. L. and Rhinehart R.R. (1995). An efficient method for on-line identification of steady state. *Journal of Process Control*, 5(6), 363-374.
- Cao S. L. and Rhinehart R.R. (1997). Critical values for a steady-state identifier. *Journal of Process Control*, 7(2), 149-152.
- Castellano M., Ruiz-Filippi G., Gonzalez W., Roca E. and Lema J.M. (2007). Selection of variables using factorial discriminant analysis for the state identification of an anaerobic UASB-UAF hybrid pilot plant, fed with winery effluents *Water Science and Technology*, 56(2), 139-145.
- Collins L.J. and Paskins A.R. (1987). Measurement of trace concentrations of hydrogen in biogas from anaerobic digesters using an exhaled hydrogen monitor. *Water Research*, 21(12), 1567-1572.
- Conrad R. and Thauer R.K. (1983). Carbon monoxide production by *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 20(2), 229-232.

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

- Cord-Ruwisch R., Mercz T.I., Hoh C-Y and Strong G.E. (1997). Dissolved hydrogen concentration as an on-line control parameter for the automated operation and optimization of anaerobic digesters. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(6), 627-634.
- Crow E., Davis F. and Maxwell M.W. (1955). *Statistics Manual*. Dover Publications, New York, USA.
- De Neve, K. and Lievens, K. (2004). On-line analyser solves monitoring problem in biodigester. *Water & Wastewater international*, 19(6):28.
- Guwy A.J., Hawkes F.R., Hawkes D.L. and Rozzi A.G. (1997). Hydrogen production in a high rate fluidised bed anaerobic digester. *Water Research*, 31(6), 1291-1298.
- Harper S.R. and Pohland F. (1987). Enhancement of anaerobic treatment efficiency through process modification. *Journal WPCF*, 59(3), 152-161.
- Hawkes F.R., Guwy A.J., Hawkes D.L. and Rozzi A.G. (1994). On-line monitoring of anaerobic digestion: application of a device for continuous measurement of bicarbonate alkalinity. *Water Science and Technology*, 30(12), 1-10.
- Hickey R., Vanderwielen J. and Switzenbaum M. (1987). The effects of organic toxicants on methane production and hydrogen gas levels during the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Research*, 21(11), 1417-1427.
- Hickey R., Vanderwielen J. and Switzenbaum M. (1989). The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion. *Water Research*, 23(2), 207-218.
- Hickey R. and Switzenbaum, M. (1990) Behavior of carbon monoxide as a trace component of anaerobic digester gases and methanogenesis from acetate. *Environmental Science and Technology*, 24 (11): 1642-1648.
- Hickey R. and Switzenbaum, M. (1991). The response and utility of hydrogen and carbon monoxide as process indicators of anaerobic digesters subject to organic and hydraulic overloads. *Journal WPCF*, 63(2): 129-140.
- Huang Y.H., Huang G.H., Chou S. and Cheng S.S. (2000). Hydrogen as a quick indicator of organic shock loading in UASB. *Water Science and Technology*, 42(3-4), 43-50.
- Jiang T.W., Chen B.Z., He X.R. and Stuart, P. (2003). Application of steady-state detection method based on wavelet transform. *Computers and Chemical Engineering*, 27(4), 569-578.
- Jones R.M., MacGregor J.F., Murphy K.L. and Hall E.R. (1992). Towards a useful dynamic model of the anaerobic wastewater treatment process: a practical illustration of process identification. *Water Science and Technology*, 25(7), 61-71.

- Kidby D.W. and Nedwell D.B. (1991). An investigation into the suitability of biogas hydrogen concentration as a performance monitor anaerobic sewage sludge digesters. *Water Research*, 25(8), 1007-1007.
- Kuroda K., Silveira R.G., Nishio N., Sunahara H. And Nagai S. (1991). Measurement of dissolved hydrogen in an anaerobic digestion process by a membrane-covered electrode. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 71(6), 418-423.
- Levenspiel O. (1995). *Ingeniería de las reacciones químicas*. Reverté Ediciones. S.A. de C.V. México.
- Liu J., Olsson G. and Mattiasson B. (2004a). Control of anaerobic reactor towards maximum biogas production. *Water Science and Technology*, 50(11), 189-198.
- Liu J., Olsson G. and Mattiasson B. (2004b). Monitoring and control of an anaerobic upflow fixed-bed reactor for high-loading-rate operation and rejection disturbances. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(1), 43-53.
- Liu J., Olsson G. and Mattiasson B. (2006). Extremum-seeking with variable gain control for intensifying biogas production in anaerobic fermentation. *Water Science and Technology*, 53(4-5), 35-44.
- Mathiot S., Escoffier Y., Ehlinger F., Couderc J.P., Leyris J.P. and Moletta R. (1992). Control parameter variations in an anaerobic fluidised bed reactor subjected to organic shockloads. *Water Science and Technology*, 25(7), 93-101.
- McCarty P. L. (1964). *Anaerobic waste treatment fundamentals*. Part two. Environmental requirements and control. *Public Works*, 95, 123-126.
- Moletta R. (1989). Comparaison de la response de differents parametres a une surcharge organique d'un digesteur anaerobie. *Environmental Technology Letters*, 10, 173-184.
- Moletta R., Escoffier Y., Ehlinger F., Coudert J.P. and Leyris J.P. (1994). On-line automatic control system for monitoring and anaerobic fluidized-bed reactor: response to organic overload. *Water Science and Technology*, 30(12), 11-20.
- Olsson G. and Nielsen M.K. (2001). *Wastewater Treatment Systems: Modelling, Diagnosis and Control*. IWA Publishing, London, England.
- Olsson G., Nielsen M.K., Yuan Z., Lynggaard-Jensen A. and Steyer J.P. (2005). *Instrumentation, control and automation in wastewater systems*. IWA Publishing, Scientific and Technical Report No. 15.
- Pauss A., Andre G., Perrier M. and Guiot S.R. (1990). Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes: inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1636-1644.

Análisis en estado estacionario y transitorio de digestores anaerobios. Selección de variables para la identificación de perturbaciones

- Pauss A. and Guiot S.R. (1993). Hydrogen monitoring in anaerobic sludge bed reactors at various hydraulic regimes and loading rates. *Water Environment Research*, 65(3), 276-280.
- Peña D. (2002). Análisis de datos multivariantes. Mc Graw Hill Interamericana de España. Madrid, España.
- Pullammanappallil P., Chynoweth D., Lyberatos G. and Svoronos S. (2001). Stable performance of anaerobic digestion in the presence of high concentration of propionic acid. *Bioresource Technology*, 78 (2):165-169.
- Puñal A., Melloni P., Roca E., Rozzi A. and Lema JM. (2001). Automatic start-up of UASB reactors. *Journal of Environmental Engineering*, may, 397-402.
- Ripley L., Boyle W. and Converse J. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, 58(5), 406-411.
- Rosen C. and Olsson G. (1998). Disturbance detection in wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 37(12), 197-205.
- Ruiz G., Roca E. y Lema J.M. (2002). Selección de variables para la identificación de estados no estacionarios en la operación de un reactor anaerobio. *Proceedings del VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia*. p. 166-172. Merida (México).
- Ruiz G., Castellano M., Gonzalez W., Roca E. and Lema J.M. (2004a). Algorithm for steady state detection of multivariate process: Application to wastewater anaerobic digestion process. In: *Proceedings of Automation in Water Quality Monitoring – AutMoNet2004*, Vienna, Austria, pp. 181-188.
- Ruiz G., Rodriguez J., Roca E. and Lema J.M. (2004b). Modification of the IWA – ADM1 for application to anaerobic treatment of ethanolic wastewater from wine factories. *Proceedings of Anaerobic Digestion 10th World Congress*, Montreal, Canada, p. 1341.
- Ruiz G. (2005a). Monitorización y control avanzado de reactores anaerobios. Tesis Doctoral, Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos, Universidad Santiago de Compostela, España.
- Ruiz G., Molina F., Steyer J.P., Vanrolleghem P., Zaher U., Roca E. and Lema J.M. (2005b). Industrial scale validation of a new titrimetric sensor for anaerobic digestion processes: comparison of methodologies. In: *Proceedings 2nd Conference on Instrumentation, Control and Automation in Water and Wastewater Treatment*, May 29-June 2, Busan, South Korea, 133-141.
- Slater W.R., Merigh M., Ricker N.L., Labib F. Ferguson J.F. and Benjamin M.M. (1990). A microcomputer-based instrumentation system for anaerobic wastewater treatment processes. *Water Research*, 24(1), 121-123.
- Speece R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press, USA.

- Steyer J.P., Bernard O., Batstone D.J., and Angelidaki I. (2006). Lessons learnt from 15 years of ICA in anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 53(4-5), 25-33.
- Switzenbaum M.S., Giraldo-Gómez E. and Hickey R.F. (1990). Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. *Enzyme and Microbial Technology*, 12 (10), 722-730.
- Szela J. and Rhinehart R.R. (2002). A virtual employee to trigger experimental conditions. *Journal of Process Analytical Chemistry*, 8(2),1-4.
- Tay, J. and Zhang, X. (2000). Stability of high-rate anaerobic systems: I. Performance under shocks. *J. Environ. Eng.* 126 (8): 713-725.
- Whitmore T.N., Lazzari M. and Lloyd D. (1985). Comparative studies of methanogenesis in thermophilic and mesophilic anaerobic digesters using membrane inlet mass spectrometry. *Biotechnology Letters*, 7(4), 283-288.
- Whitmore T.N. and Lloyd D. (1986). Mass spectrometric control of the thermophilic anaerobic digestion process based levels of dissolved hydrogen. *Biotechnology Letters*, 8(3), 203-208.
- Whitmore T.N., Lloyd D., Jones G. and Williams T.N. (1987). Hydrogen-dependent control of the continuous anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 383-388.
- Zaher U. and Vanrollegen P. (2005). Automatic initialisation of buffer composition estimation for on-line analysis of unknown buffer solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383(4), 605-618.

Capítulo 5

Evolución de la ecología microbiana y características técnicas de gránulos anaerobios sometidos a diferentes aguas residuales

Resumen

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos del seguimiento de una biomasa anaerobia sometida a diferentes sustratos tipo (etanol, hidratos de carbono y proteína). El estudio se llevó a cabo en reactores de laboratorio empleando los tres sustratos tipo durante un año de operación y en planta piloto para el sustrato tipo que contenía hidratos de carbono, también durante 1 año.

Se evaluaron las características físicas, composición química, características hidrodinámicas y las actividades metanogénica y acidogénica de la biomasa anaerobia. La morfología de los microorganismos presentes en la superficie de los gránulos se estudió aplicando microscopía electrónica de barrido (SEM).

Por último, combinando la técnica de identificación de microorganismos por FISH con microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal se realizó la identificación y cuantificación relativa de algunos de los principales microorganismos presentes en la biomasa.

La configuración de los reactores utilizados influyó directamente en las características finales de la biomasa. En el reactor piloto híbrido (USBF), al cambiar de un sustrato simple (etanol) a un sustrato no acidificado (dextrina), se presentó la retención de biomasa floculenta, la expansión del lecho de lodo, el lavado de biomasa y el posterior deterioro de la biomasa granular al presentarse la ruptura parcial de los gránulos. Por el contrario, en los reactores UASB, la biomasa floculenta fue lavada y, por tanto, permaneció la estructura granular del lodo.

Al someter la biomasa granular aclimatada a un sustrato simple (etanol), a sustratos complejos o no acidificados (dextrina y proteína), los gránulos originales fueron colonizados por nueva biomasa, compuesta por bacterias acidogénicas y microorganismos metanogénicos. Dicha colonización generó un aumento importante en el tamaño de los gránulos y aumentos considerables en la actividad acidogénica específica y en la actividad metanogénica hidrogenófila.

Índice

5.1. Introducción

- 5.1.1. Estructura de la biomasa granular
- 5.1.2. Características físicas
- 5.1.3. Composición química
- 5.1.4. Composición microbiológica
- 5.1.5. Actividad

5.2. Materiales y métodos

- 5.2.1. Equipos experimentales
- 5.2.2. Microscopía electrónica de barrido
- 5.2.3. Flourescent *in situ* Hybridation (FISH)

5.3. Resultados y discusión

- 5.3.1. Evolución de la biomasa en reactores de laboratorio
- 5.3.2. Evolución de la biomasa en planta piloto

5.4. Conclusiones

5.5. Referencias

5.1. Introducción

La estructura y características de los gránulos formados en los reactores anaerobios han sido ampliamente estudiadas en los últimos años por diversos investigadores. En este apartado se realizará una revisión bibliográfica sobre el tema, centrada en los aspectos de mayor interés para este trabajo como son: estructura de la biomasa granular, características morfológicas e hidrodinámicas, actividad, composición química y distribución de poblaciones microbianas de los gránulos.

La inoculación con biomasa granular de otro reactor es un modo usual de realizar el arranque de reactores anaerobios. Esta estrategia generalmente implica el cambio de sustrato y hace necesario un período de aclimatación. El objetivo de este capítulo es estudiar las características y la distribución de los microorganismos presentes en una biomasa granular desarrollada en reactores UASB y USBF, cuando el tipo de sustrato es modificado desde un sustrato acidificado simple a un sustrato no acidificado o a un sustrato complejo.

5.1.1. Estructura de la biomasa granular

La tercera generación de reactores anaerobios presenta como cualidad principal su capacidad para retener biomasa. Esta característica permite separar el tiempo de retención celular del tiempo de retención hidráulico. La capacidad de retener biomasa depende en gran medida de la formación de agregados, denominados gránulos, que pueden alcanzar una alta actividad metanogénica ($2 \text{ g DQO-CH}_4\text{:g SSV}\cdot\text{d}^{-1}$) y una alta velocidad de sedimentación ($60 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) (Hulshoff Pol *et al.*, 2004).

La inmovilización de la biomasa anaerobia se puede lograr suministrando materiales de soporte (reactores de biomasa fija) o favoreciendo la formación de gránulos (reactores de biomasa suspendida). La auto-inmovilización por formación de gránulos fue observada inicialmente en reactores UASB por Lettinga *et al.* (1980).

El conocimiento de la estructura y del desarrollo de los gránulos son las claves para controlar su proceso de formación y mantenimiento. MacLeod *et al.* (1990) propusieron para los gránulos desarrollados en reactores UASB un modelo de estructura de tres capas: una capa exterior formada por una población heterogénea, una capa intermedia que contiene microorganismos productores y consumidores de hidrógeno y una zona central del gránulo dominada por microorganismos metanogénicos acetotróficos (*Methanosaeta spp.*). Este modelo fue posteriormente confirmado por Guiot *et al.* (1992) para gránulos alimentados con sacarosa; indicando que la estructura de múltiples capas favorece una

organización metabólica y crea condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de los microorganismos involucrados.

La composición y la estructura de los gránulos metanogénicos está fuertemente relacionada con el tipo de sustrato utilizado. Grotenhuis *et al.* (1991a) identificaron en gránulos cultivados con propionato y etanol, diferentes microorganismos distribuidos al azar, sin presentar una distribución específica; lo que indica que la teoría de estructura por capas planteada por MacLeod *et al.* (1990) no es general.

Fang *et al.* (1994a, 1994b, 1995a) y Fang (2000) estudiaron las características de los gránulos anaerobios provenientes de reactores alimentados con diferentes sustratos; en esos estudios se identificaron dos tipos de estructuras granulares. En primer lugar, los gránulos desarrollados en sustratos ricos en carbohidratos presentan una estructura de tres capas, coincidiendo con el modelo propuesto por MacLeod *et al.* (1990). Sin embargo, los gránulos alimentados con sustratos complejos (como proteínas) y con ácidos grasos volátiles (AGV) presentan una distribución de microorganismos al azar.

Vanderhaegen *et al.* (1992) demostraron que los sustratos que contienen una alta energía (p.e. carbohidratos) favorecen el desarrollo de los gránulos anaerobios. Adicionalmente, dichos investigadores al evaluar las diferencias de pH dentro del gránulo, identificaron una estructura por capas, con una capa externa dominada por bacterias acidogénicas, que utilizan una parte importante de la energía suministrada por el sustrato y, por tanto, son una fracción muy importante de la biomasa total contenida en el gránulo.

Esta organización por capas aparentemente está relacionada con la cinética de degradación de los sustratos (Guiot *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1995b, Fang, 2000). De esta manera para los hidratos de carbono que presentan en las primeras etapas de degradación (hidrólisis y acidificación) velocidades muy superiores que en las etapas subsiguientes se genera una estructura del gránulo por capas; con una capa externa compuesta principalmente por bacterias acidogénicas; una capa intermedia compuesta por microorganismos acetogénicos (productores de H₂) y consumidores de H₂ y una capa interna de microorganismos metanogénicos.

De otro lado, para sustratos complejos, en los que las etapas de hidrólisis y acidificación suelen ser las limitantes, se desarrolla una distribución uniforme de microorganismos en el gránulo. Esta hipótesis no está completamente justificada, debido a que en estudios cinéticos de degradación de aguas residuales con alto contenido de proteína se ha encontrado que la hidrólisis y la fermentación ocurren rápidamente (Ramsay and Pullammanappallil, 2001).

Diferentes investigadores (Hamersen *et al.*, 1996; Sekiguchi *et al.*, 1999 y Díaz *et al.*, 2003) encontraron en gránulos desarrollados tanto con sustratos simples

(hidratos de carbono y acetato) como con sustratos complejos (butirato, propionato y peptona), una estructura por capas, con una zona externa dominada por bacterias y en la zona interior del gránulo una mezcla de bacterias sintróficas y arqueas como microorganismos dominantes.

Lanthier *et al.* (2002) realizaron estudios sobre dinámica de colonización con *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 sobre biomasa granular proveniente de un digestor industrial. Estos investigadores encontraron que la colonización se desarrolló a través de la formación de biopelículas sobre los gránulos originales, demostrando que los gránulos anaerobios constituyen una matriz adecuada de soporte para microorganismos exógenos. Estos resultados tienen importantes implicaciones en la posibilidad de diseñar gránulos con capacidades específicas de bioremediación.

Saiki *et al.* (2002) estudiaron gránulos provenientes de una depuradora de aguas residuales de la industria cervecera utilizando la técnica FISH, encontrando en los gránulos con mejores características de sedimentación el predominio del género *Methanosaeta* cerca de la superficie y escasa presencia de Bacteria en la superficie. En el centro, el gránulo estaba formado por restos de células sirviendo como soporte a las poblaciones de Arqueas y Bacterias. Los gránulos provenientes de otros reactores que presentaban una capa externa compuesta principalmente por Bacteria mostraron tendencia a flotar. Basándose en estos hechos, Saiki y colaboradores concluyen que en los gránulos con buena sedimentación los microorganismos metanogénicos se desarrollan cerca de la superficie de manera que los gases producidos se liberan fácilmente.

Batstone *et al.* (2004) identificaron una estructura compuesta por múltiples capas en gránulos de reactores industriales que trataban aguas residuales de la producción de conservas de vegetales y producción de cerveza. Mientras que en gránulos provenientes de un reactor híbrido tratando aguas residuales del sacrificio de cerdos (agua residual rica en proteína), identificaron una distribución irregular de agrupaciones de microorganismos tentativamente identificados como *Methanosaeta spp* en la parte interna del gránulo.

Baloch *et al.* (2007) identificaron una estructura formada por múltiples capas, dominada por el género *Methanosaeta* en el centro de gránulos desarrollados en un reactor de fases separadas y flujo pistón depurando aguas residuales de la fabricación de cerveza.

5.1.2. Características físicas

Las principales características físicas estudiadas en la biomasa granular son: distribución por tamaño, densidad, velocidad de sedimentación, grado de compactación al sedimentar y resistencia a la abrasión y fuerzas mecánicas.

La distribución por tamaño de la biomasa granular depende de múltiples factores como la adición de nutrientes, el lavado de biomasa, las limitaciones de difusión de sustratos y productos dentro del gránulo, el estrés hidráulico y la producción de polímeros extracelulares (Grotenhuis *et al.*, 1991b; Franco *et al.*, 2006). El diámetro medio de los gránulos puede variar entre 0,1 y 8 mm (Grotenhuis *et al.*, 1991a; Guiot *et al.*, 1992; Pereboom, 1994; Pereboom and Vereijken, 1994; Hulshoff Pol *et al.*, 2004).

La densidad y la distribución por tamaño de la biomasa granular, están relacionadas con características hidrodinámicas, tales como la velocidad de sedimentación (V_s) y el grado de compactación que puede conseguirse al sedimentar la biomasa (estimado generalmente por el índice volumétrico de lodos – IVL) (Grotenhuis *et al.*, 1991b).

Grotenhuis *et al.* (1991b) evaluaron el efecto de las concentraciones de sustrato en la distribución por tamaño de una biomasa granular en un UASB; al incrementar las concentraciones de sustrato se incrementó el tamaño de los gránulos y su actividad metanogénica. Para estos investigadores el incremento en el tamaño del gránulo y su actividad puede explicarse parcialmente a partir del crecimiento y la muerte de la biomasa. A concentraciones altas de sustrato, este penetra hasta el centro del gránulo y el gránulo aumenta de tamaño. Cuando el flujo de sustrato en el centro del gránulo disminuye tiene lugar la muerte de los microorganismos. Las fuerzas de corte generadas por el fluido inciden en la reducción del tamaño del gránulo o en un caso extremo generan su disgregación. De esta manera se establece un equilibrio dinámico entre el tamaño del gránulo, la concentración del sustrato y las fuerzas de corte.

Tay and Yan (1996) estudiaron la influencia de las concentraciones de sustrato en varias características de la biomasa granular, entre ellas el diámetro de los gránulos, encontrando que a menores concentraciones de sustrato se presentan gránulos de diámetros mayores; estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Grotenhuis *et al.* (1991b). La principal razón para esta diferencia según los autores, se debe al estrés producido en los gránulos por la velocidad ascensional del biogás.

Existe una clara relación entre las limitaciones a la transferencia de masa y el tamaño del gránulo (Gonzalez-Gil *et al.* 2001a). Estos investigadores encontraron una relación directa entre el incremento del tamaño del gránulo y el aumento del valor de la constante de saturación aparente (K_s).

Pereboom (1994), utilizando la técnica de clasificación de diámetros por tamices, estudió gránulos provenientes de diferentes reactores industriales UASB e IC. La biomasa granular de reactores operados a altas velocidades de carga

orgánica, como en el caso de los reactores IC, presentó mayor diámetro promedio pero menor resistencia a la abrasión. En este estudio se concluye además que la densidad de los gránulos está correlacionada directamente con su contenido de material inorgánico (cenizas).

Jeison and Chamy (1998) desarrollaron una técnica sencilla de análisis digital de imágenes para estimar la distribución por tamaño de biomasa granular proveniente de reactores anaerobios; utilizando gelatina en la inmovilización de la muestra y un escáner en la digitalización de la imagen. Los mismos autores identificaron en sendos reactores UASB y EGSB, el aumento del diámetro medio de la biomasa granular cuando se aplicaban velocidades ascensionales altas (0,5 a 1,3 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ para el reactor UASB y 2 a 8 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ en el reactor EGSB) (Jeison and Chamy, 1999).

Gonzalez-Gil *et al.* (2001b) utilizando la técnica de análisis de imágenes, evaluaron los cambios en la biomasa granular inoculada en un reactor EGSB tratando aguas residuales de una cervecería (compuestas principalmente por etanol). El diámetro medio de los gránulos se incrementó de 1,5 a 3,5 mm durante un año de operación del reactor, coincidiendo con la aparición de grupos (clusters) de *Methanosaeta* distribuidos al azar en el gránulo.

Batstone and Keller (2001) encontraron claras diferencias en la forma y distribución de tamaño de lodos granulares provenientes de reactores industriales. La biomasa proveniente del tratamiento de aguas residuales de conservas de vegetales presentó un amplio rango de tamaños (0,5 a 2,3 mm), mientras que los gránulos que provenían del tratamiento de efluentes con elevado contenido en proteínas y aguas residuales de fabricación de cerveza presentaron distribuciones más homogéneas (1 a 2 mm).

Varios autores han analizado la relación entre la actividad acidogénica y metanogénica con el tamaño de los gránulos. Se acepta que la actividad específica es directamente proporcional a la cantidad de microorganismos viables presentes en la biomasa. Así, Guiot *et al.* (1992) realizaron diversos estudios sobre la relación tamaño-actividad específica de biomasa anaerobia suspendida; concluyendo que existe una asociación entre bacterias acidogénicas y metanogénicas hidrogenotróficas con lodo suspendido o floculento; mientras que actividad metanogénica acetoclástica importante ($> 0,15 \text{ g DQO-CH}_4\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) sólo se presenta en gránulos con diámetros mayores de 0,5 mm. Adicionalmente, estos autores, al estudiar la evolución de biomasa granular sometida a diferentes velocidades ascensionales, encontraron una relación directa entre el aumento de tamaño de los gránulos y el aumento de su actividad metanogénica acetotrófica.

Elias *et al.* (1999) encontraron un aumento importante en el tamaño de los gránulos anaerobios al operar durante 300 días un reactor UASB de laboratorio alimentado con glucosa (sustrato no acidificado) e inoculado con biomasa granular proveniente de una depuradora de aguas residuales de la producción de bebidas alcohólicas. El diámetro final de los gránulos presentó valores entre 0,96 y 3,97 mm; mientras que el rango inicial de diámetro de la biomasa inoculada fue de 0,45 a 0,92 mm. Dicho aumento se explica a partir del recubrimiento de los gránulos con nueva biomasa en forma de capas, generando un lodo con baja sedimentabilidad, baja resistencia mecánica y tendencia a atrapar el biogás.

Otra característica estudiada es la resistencia de la biomasa granular al desgaste y/o disgregación debido a fuerzas mecánicas. Pereboom (1997) desarrolló una metodología para estimar dicha resistencia, basada en la medida de la tasa de abrasión sometiendo la biomasa a diferentes grados de agitación mecánica (vaso agitado) o por gas (columna de burbujeo). Concluye que los gránulos provenientes de sistemas con tasas lentas de crecimiento de la biomasa presentan una mayor resistencia a la abrasión, que disminuye al aumentar el tamaño del gránulo.

5.1.3. Composición química

La composición elemental de la biomasa anaerobia granular es similar a la composición elemental de las bacterias en general; los valores de proteína e hidratos de carbono (alrededor del 50% y 7% del peso seco, respectivamente) son comparables con la composición típica de las bacterias; el contenido de cenizas del orden de 10 a 23 % esta relacionado principalmente con la presencia de precipitados de sulfuro de hierro que son los responsables del color negro de los gránulos (Dolfing, 1986).

Elias *et al.* (1999) desarrollaron biomasa granular en dos reactores UASB alimentados con glucosa uno y una mezcla de AGV el otro; encontraron relaciones C:H:N (42:7:9) idénticas en ambas biomazas granulares.

La composición mineral puede tener un impacto significativo en la densidad y por lo tanto en la velocidad de sedimentación de los gránulos (Pereboom, 1994; Batstone and Keller, 2001). Los principales constituyentes de la fracción inorgánica de los gránulos son: calcio, fósforo, hierro y azufre (Wu *et al.*, 1991; Uemura and Harada, 1995; Gonzalez-Gil *et al.*, 2001b; Batstone and Keller, 2001).

Gonzalez-Gil *et al.* (2001b) encontraron que en secciones de gránulos de biomasa granular de un EGSB que depuraba aguas residuales industriales de la producción de cerveza, había altas concentraciones de calcio y fósforo predominando en las zonas de color blanco; mientras que, en las regiones de color negro, predominaban los precipitados de hierro.

5.1.4. Composición microbiológica

Existe consenso en la mayoría de los investigadores sobre el predominio del microorganismo acetotrófico *Methanosaeta* en los gránulos anaerobios y su importancia en la estructuración del gránulo debido a su morfología filamentosa (Dolfing, 1986; Guiot *et al.*, 1992; Fang, 2000; Saiki *et al.*, 2002; Angenent *et al.*, 2004; Hulshoff Pol *et al.*, 2004).

Dependiendo de la concentración del sustrato se han identificado dos tipos de gránulos, con concentraciones de 1 a 5 g DQO·L⁻¹ se forman gránulos de mayor tamaño (2 a 4 mm) y mejores características de sedimentación, dominados por *Methanosaeta*. Al aplicar concentraciones altas del orden de 10 g DQO·L⁻¹ se forman gránulos de menor tamaño (0,5 a 1 mm) dominados por *Methanosarcina* (Tay and Yan, 1996).

Tay *et al.* (2001), proponen la utilización de la relación del contenido de ADN ribosomal de Arqueas y Bacterias como parámetro en la monitorización de la diversidad microbiológica en digestores anaerobios. Dichos investigadores asocian una mayor presencia de Arqueas en la biomasa anaerobia con sustratos que contienen principalmente monómeros como fuente de carbono; mientras que sustratos compuestos por biopolímeros requieren de una mayor presencia de Bacterias responsables de las etapas iniciales de degradación.

En lodos granulares de un reactor EGSB tratando aguas residuales de la producción de cerveza, Gonzalez-Gil *et al.* (2001b) utilizando FISH en biomasa disgregada encontraron una proporción de 70% y 30% para los dominios de Arquea y Bacteria respectivamente.

Diaz *et al.* (2003) encontraron claras diferencias dependiendo del tipo de sustrato, en la composición microbiológica de lodos granulares. Utilizando la técnica FISH, dichos investigadores identificaron en lodos granulares alimentados con sacarosa, almidón y peptona la presencia de los dominios Arquea y Bacteria en proporciones similares de aproximadamente un 50 %, mientras que en lodos granulares alimentados con AGV, el dominio Arquea representa un 90 % de los microorganismos activos.

Angenent *et al.* (2004), utilizando membranas cuantitativas de hibridación en gránulos alimentados con agua residual sintética (AGV + sacarosa), encontraron la siguiente distribución de microorganismos: Bacteria (18,2±6,2%), *Methanosaeta concilii* (52,2±11,4%), *Methanosarcina spp* (24,0±4,3%) y del orden *Methanomicrobiales* (20,2 ±8,4%).

La diversidad en las comunidades metanogénicas ha sido estudiada en digestores de lodos tratando diferentes tipos de residuos sólidos. Así, Karakashev *et al.* (2005), evaluaron 15 digestores alimentados con estiércol o lodo proveniente de depuradoras aerobias. Estos investigadores observaron una clara dicotomía en las características entre los microorganismos presentes en digestores alimentados con estiércol y los presentes en digestores alimentados con lodos. En los digestores de estiércol, con altos niveles de amonio y AGV, el género *Methanosarcina* aparece

como microorganismo dominante. Sin embargo, el género *Methanosaeta* predomina en los digestores de lodos que presentan bajas concentraciones de amonio y AGV.

5.1.5. Actividad

La actividad de la biomasa anaerobia puede considerarse desde dos enfoques. Uno de ellos daría una medida global que ofrece información sobre el conjunto del proceso de degradación y, el otro, una medida de la actividad específica en cada una de las etapas básicas del proceso (Soto *et al.*, 1993). Tomando este último enfoque, las actividades específicas asociadas a cada etapa básica del proceso son hidrolítica, acidogénica, acetogénica y metanogénica.

Las actividades metabólicas específicas de los lodos anaerobios pueden determinarse fácilmente utilizando ensayos en discontinuo y sustratos definidos (Guiot *et al.*, 1992; Soto *et al.*, 1993).

La hidrólisis la realizan enzimas extracelulares que actúan sobre los materiales complejos (carbohidratos, proteínas y lípidos) presentes en las aguas residuales; dependiendo de la complejidad del material inicial, la hidrólisis puede ser la etapa limitante en la digestión anaerobia, en esos casos es fundamental determinar la actividad hidrolítica específica (Soto *et al.*, 1993). En el presente trabajo, debido a que se utilizaron sustratos simples o hidrolizados (ver capítulo 2 apartado 2.2), no se realizaron determinaciones de la actividad hidrolítica específica de la biomasa.

Aunque la acidogénesis normalmente no es la etapa limitante de la digestión anaerobia, evaluar la actividad acidogénica específica permite obtener información valiosa sobre el desarrollo de la biomasa y el comportamiento dinámico del proceso (Guiot *et al.*, 1992; Soto *et al.*, 1992). Soto *et al.* (1992) encontraron en la biomasa de un filtro anaerobio mesofílico, actividades acidogénicas específicas con valores de 15 a 25 g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹. Guiot *et al.* (1992) reportan actividades acidogénicas específicas del orden de 2 a 22 g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹ en biomasa granular de reactores UASB mesofílicos.

La actividad acetogénica evalúa la producción de ácido acético a partir de AGV más complejos como los ácidos propiónico, butírico y valérico; esta labor la realizan las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA, *obligate hydrogen producing acetogens*). Para que este proceso sea factible termodinámicamente, se requiere que las bacterias acetogénicas se acoplen con las bacterias metanogénicas consumidoras de hidrogeno en una asociación simbiótica, a través del mecanismo denominado "transferencia interespecífica de hidrógeno" (Diaz-Baez *et al.*, 2002).

La determinación de la actividad metanogénica específica es útil en diversas situaciones; en el proceso de arranque de un reactor para estimar la VCO inicial;

durante la operación del reactor para evaluar el desarrollo de la biomasa granular y el efecto de posibles inhibidores o tóxicos en la biomasa (Soto *et al.*, 1993).

Los valores de la actividad metanogénica específica están relacionados con el tipo de sustrato utilizado en la determinación; generalmente los valores más altos (1 a 2,6 g DQO-CH₄·g SSV·d⁻¹) de la AME se presentan para los sustratos formiato y la mezcla gaseosa H₂/CO₂, utilizados por los microorganismos metanogénicos hidrogenófilos (Wu *et al.*, 1991; Guiot *et al.*, 1992; Gonzalez-Gil *et al.*, 2001a).

Para el sustrato acetato las AME pueden oscilar entre 0,1 y 1,1 g DQO-CH₄·g SSV·d⁻¹ (Guiot *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1994a; Fang *et al.*, 1994b; Jawed and Tare, 1999; Gonzalez-Gil *et al.*, 2001a). Con este sustrato se puede estimar la actividad de los microorganismos metanogénicos acetoclásticas.

5.2. Materiales y métodos

En este apartado se presentan los equipos experimentales y los métodos específicos utilizados en el estudio de la evolución de la biomasa anaerobia. Se utilizaron 3 reactores de laboratorio y una planta piloto anaerobia que ha sido descrita en el apartado 2.3 del capítulo 2.

Se describen las siguientes metodologías específicas: microscopía electrónica de barrido (SEM) y la técnica de identificación de microorganismos por Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) combinada con microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal. Las demás metodologías utilizadas se presentan en el apartado 2.1.

Se trabajó con los sustratos sintéticos (etanol, hidratos de carbono y proteína hidrolizada), que fueron descritos en el apartado 2.2.

5.2.1. Equipos experimentales

Reactores de laboratorio

Se utilizaron 3 reactores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Bed) de 5 L de volumen útil, contruidos en plexiglás, con un diámetro de 110 mm, dotados en la parte inferior de 3 puntos de toma de muestra de biomasa (Figura 5.1).

La separación sólido-líquido-gas se realiza en la parte superior del reactor utilizando un embudo plástico invertido, dotado de ranuras en el borde de manera que el líquido efluente circule; el embudo se conecta a un tubo y este a una manguera que permite la conducción del biogás para cuantificar su caudal utilizando un medidor por desplazamiento y permitir la toma de muestras para evaluar la composición del biogás.

La alimentación de los reactores se realiza a través de un tubo con diámetro de 10 mm orientado hacia la base procurando una buena distribución del flujo vertical, la salida se realiza mediante una tubería de 25 mm colocada a una distancia de 90 mm por encima de la base de apoyo del embudo plástico invertido, el embudo se utiliza como separador gas-sólido-líquido. La salida esta conectada con un recipiente cilíndrico de 300 mL de volumen. Se toma la recirculación de efluente de la parte inferior de dicho recipiente, saliendo el efluente restante por rebose, almacenándose en una bolsa plástica de 10 L.

Con el fin de asegurar condiciones similares de temperatura los reactores se colocaron dentro de una cámara de temperatura controlada a 37 ± 2 °C. La alimentación se preparó en bolsas plásticas de 10 L, combinando el sustrato con los macro y micronutrientes y se mantuvo refrigerada a 4 °C. La figura 5.2 presenta una vista general del montaje de laboratorio utilizado.

Se utilizó una bomba peristáltica (Masterflex) con tres cabezales para impulsar la corriente de alimentación, de esta manera se aseguró un mismo caudal de alimentación en los tres reactores. La recirculación fue provista por otra bomba peristáltica (Masterflex), también dotada de tres cabezales, el caudal de recirculación asegura una velocidad ascensional del orden de $0,5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

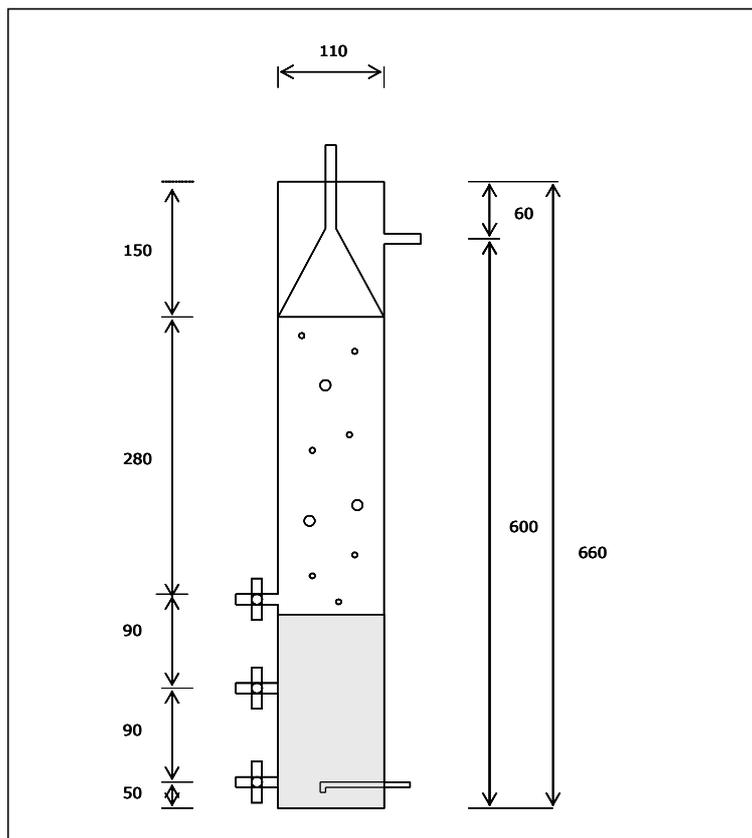


Figura 5.1. Esquema y dimensiones en mm de los reactores UASB de laboratorio

El tiempo de retención hidráulico (TRH) se fijó en 48 h. Las velocidades de carga orgánica aplicadas (VCO) son en su orden 5, 3,5 y 3 $\text{kg DQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ para los sustratos etanol, hidratos de carbono y proteína respectivamente.

La biomasa utilizada para inocular los tres reactores fue tomada de la planta piloto descrita en el capítulo 2, se utilizaron aproximadamente 50 g de SSV para inocular cada reactor. Esta biomasa estaba aclimatada al sustrato etanol ya que la planta piloto fue operada con dicho sustrato durante 3 años consecutivos antes de extraer la biomasa utilizada como inóculo.

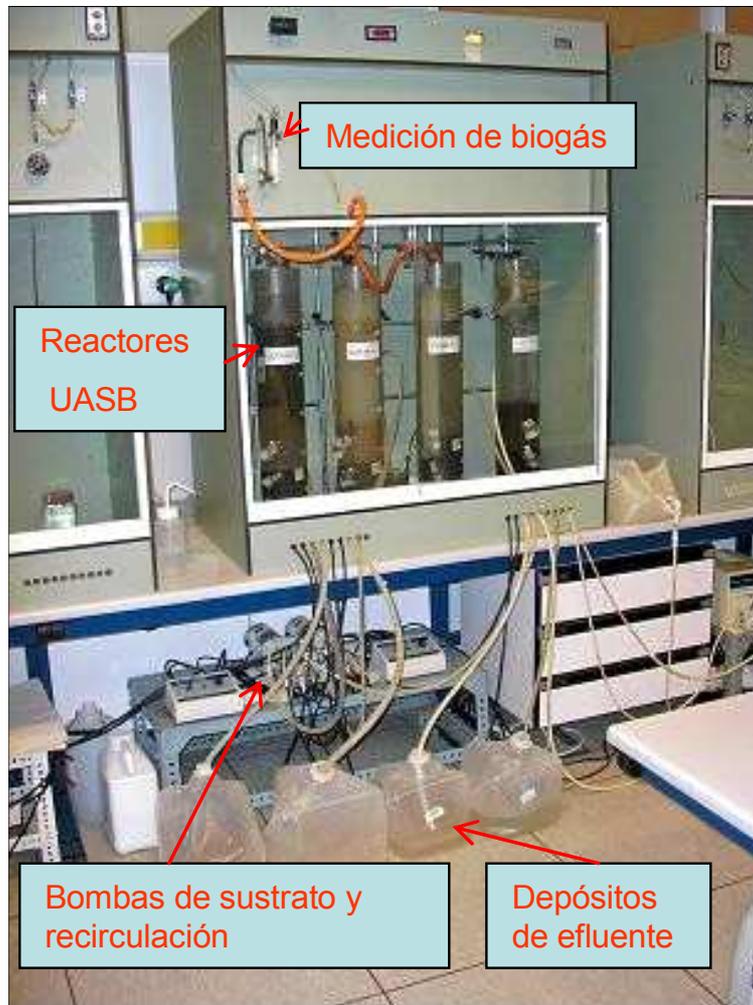


Figura 5.2. Montaje experimental en laboratorio

Planta Piloto

En forma paralela a la operación de los reactores de laboratorio se estudió la evolución de la biomasa frente a cambios en el sustrato en la planta piloto anaerobia descrita en el capítulo 2. El lodo original, aclimatado al sustrato etanol, fue sometido a un sustrato en base a hidratos de carbono durante 12 meses.

5.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de la biomasa granular fue estudiada utilizando un microscopio electrónico de barrido Leica 440, con capacidad de aumento comprendida entre 15 y 290000 y resolución de 4,5 nm.

Las muestras de biomasa granular se prepararon de la siguiente manera: tres lavados durante 10 minutos con tampón fosfato 0,05 N a pH 7,4, fijado durante una noche con solución de paraformaldehído al 1 % en tampón fosfato, deshidratación empleando soluciones de etanol del 50, 80 y 98 % durante 30 minutos con cada una. Alternativamente se realizó la deshidratación utilizando soluciones de acetona del 50, 80 y 99%, realizando posteriormente la operación de secado por punto crítico.

Los gránulos se colocan enteros o fracturados en un soporte adecuado y como último paso, antes de la observación al microscopio, se realizó el sombreado con oro de su superficie. El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) permite la observación de la superficie de los gránulos, identificando su estructura y topografía; pudiéndose determinar el tamaño, la forma y la localización de los microorganismos presentes.

5.2.3. Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)

En la identificación de algunos microorganismos específicos en la biomasa se utilizó la técnica de FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization). En FISH se utilizan cadenas artificiales de oligonucleótidos (ACGT) que contienen un tinte fluorescente y que son complementarias a la sub-unidad 16S rARN presente en los ribosomas de los organismos procariotas (dominios *bacteria* y las *archaea*).

La sub-unidad 16S rRNA posee una estructura específica que diferencia un grupo filogenético particular del resto de los microorganismos. La cadena artificial complementaria a la sub-unidad 16S rRNA contiene un tinte fluorescente (flurocromo) que marca el microorganismo y permite identificarlo usando un microscopio de epifluorescencia; en nuestro caso se utilizaron un microscopio Axioskop 2 plus (Zeiss) y un microscopio confocal espectral (CLSM) TCS-SP2 (Leica).

Se utilizaron los siguientes flurocromos: fluoresceína (FITC) y carbocianina (Cy3). Además, se suele emplear la tinción con el 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorohidrato (DAPI) para visualizar todas las células presentes en la muestra ya que el DAPI es una molécula que se une al ADN. En la tabla 5.1 se presenta las sondas utilizadas, el grupo filogenético, la concentración de formamida utilizada y las referencias bibliográficas para cada sonda.

Evolución de la ecología microbiana y características técnicas de gránulos anaerobios sometidos a diferentes aguas residuales

Tabla 5.1. Sondas utilizadas en el análisis FISH

Sondas	Grupo filogenético	Formamida (%)	Secuencia de la sonda (5' – 3')	Referencia
EUB338	Dominio <i>Eubacteria</i>	35	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann <i>et al.</i> , 1990
ARC915	Dominio <i>Archaea</i>	35	GTGCTCCCCGCAATTCCT	Stahl and Amann, 1991
MX825	<i>Methanosaeta</i> (metanogénica acetoclástica)	45	TCGCACCGTGCCGACACCTAGC	Raskin <i>et al.</i> , 1994
MB1174	<i>Methanobacteriaceae</i> (metanogénica hidrogenotrófica)	45	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	Raskin <i>et al.</i> , 1994

La técnica FISH se aplicó mediante la siguiente secuencia: disgregación y fijación de la biomasa, inmovilización de la biomasa, hibridación y por último observación al microscopio. A continuación se detallan los reactivos y los procedimientos utilizados.

Reactivos para la fijación de las células

- Solución tampón de fosfato salino (PBS) (3x); 390 mM NaCl en 30 mM tampón fosfato (pH 7,2): Se disuelven 0,49 g KH₂PO₄ en 80 mL de H₂O, se añaden 2,3 g NaCl y se ajusta el pH a 7,2. Finalmente se lleva a un volumen total de 100 mL.
- PBS (1x); 130 mM NaCl en 10 mM tampón fosfato (pH 7,2): Se toman 33 mL de PBS (3x) y se ajusta el volumen a 100 mL con agua destilada.
- 4% para-formaldehído en PBS: Ver a continuación en preparación del fijador (se deben usar guantes ya que el para-formaldehído es muy tóxico). Agua milliQ a 4°C.
- 1 M NaOH.
- 1 M HCl.
- Etanol 50%, 80% y 98%.
- Etanol 98% a -20°C.

Reactivos para la hibridación

- NaCl 5 M.
- Tris/HCl 1 M (pH = 8,0): Se disuelven 12,1 g de Tris base en 80 mL de agua milliQ, se ajusta el pH a 8,0 con HCl y se ajusta el volumen a 100 mL.
- Formamida.
- Na₂EDTA 0,5 M (pH = 8,0): Se disuelven 18,1 g Na₂EDTA en 80 mL, se ajusta el pH a 8,0 y se enrasa el volumen a 100 mL.
- SDS 10% (v/v): Se disuelven 2 g de dodecilsulfato de sodio en 20 mL de agua milliQ.

Capítulo 5

Preparación del fijador

Se debe usar solamente fijador fresco preparado con menos de 24 h de anterioridad. El procedimiento es el siguiente: Se calientan 6,5 mL de agua milliQ a 60°C, se añaden 0,4 g de para-formaldehído, se añade una gota de NaOH 1 M y se agita vigorosamente hasta que se haya disuelto completamente (1-2 min). Se retira la solución de la fuente de calor y se añaden 3,3 mL de PBS (3x), se ajusta el pH a 7,2 con HCl (una gota de HCl 1 M), se filtra la solución a través de un filtro de membrana de 0,2 micras. Se debe mantener la solución en hielo hasta su utilización.

Preparación del tampón de hibridación

Pipetear, en un vial eppendorf de 2 mL, 360 μ L de NaCl (5 M) y 40 μ L de Tris/HCl (pH = 8,0), se añade formamida y agua MilliQ de acuerdo con la tabla 5.2, por último se añaden 4 μ L SDS (10% peso/volumen).

Tabla 5.2. Cantidades de formamida y agua milliQ añadidas según % de formamida

Formamida % (v/v)	Formamida (μ L)	H ₂ O milliQ (μ L)
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1000	600
55	1100	500
60	1200	400
65	1300	300

Preparación del tampón de lavado

Se pipetea en un tubo Falcon de 50 mL: 1 mL de Tris/HCl (pH = 8,0), se le añade NaCl (5 M) y EDTA (0,5 M) de acuerdo con la tabla 5.3; se llena el tubo Falcon hasta 50 mL con agua MilliQ. Finalmente se precalienta el tampón de lavado a 48°C antes de su uso.

Tabla 5.3. Cantidades de NaCl y EDTA según % de formamida

Formamida% (v/v)	NaCl (mM)	NaCl 5 M (μ L)	EDTA 0,5 M (μ L)
0	0,900	9000	-
5	0,636	6300	-
10	0,450	4500	-
15	0,318	3180	-
20	0,225	2250	500
25	0,159	1590	500
30	0,112	1120	500
35	0,080	800	500
40	0,056	560	500
45	0,040	400	500
50	0,028	280	500
55	0,020	200	500
60	0,008	80	500
70	0,000	0	350

Preparación de las sondas

Las sondas de oligonucleótidos utilizadas fueron adquiridas a la compañía Thermo Electron Corporation, estas sondas se distribuyen en forma liofilizada, de forma que el fabricante especifica la cantidad de agua MilliQ que hay que añadir para alcanzar una concentración de $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. La concentración final de las sondas es de $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para las sondas con marcador FITC y $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para las que contienen Cy3.

Disgregación de la muestra

Con el fin de obtener muestras adecuadas para la aplicación del FISH y observarlas en el microscopio, los gránulos se disgregaron utilizando ultrasonido de la siguiente manera: en un tubo de 10 mL de plástico se añade 1 mL de muestra y 1,5 mL de PBS (1x), sumergiendo el tubo en un baño de hielo se aplica ultrasonido durante 1 min con frecuencia al 60%, ciclo de 0,5 seg. Se utilizó un aparato de ultrasonidos UP200s (Dr. Hielscher GmbH) con un generador de ultrasonidos, también denominado sonotrodo, modelo S3.

Fijación de las células

Una vez que la muestra ha sido disgregada, se procede a lavarla con PBS (1x) y se concentra por centrifugación retirando luego el sobrenadante, repitiendo el proceso tres veces. Se resuspende la muestra con PBS 81x) y se añaden 3 volúmenes de fijador por volumen de muestra. Para que actúe el fijador se mantiene la muestra refrigerada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 horas. Luego se lava y resuspende la muestra con PBS (1x) y se agregan 1,25 volúmenes de etanol al 98 % por volumen de muestra, se almacena la muestra a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, garantizando la calidad de la muestra durante varios meses.

Inmovilización

La muestra se inmoviliza en portaobjetos que contienen 8 pocillos, previamente lavados con agua destilada. Se añaden a cada pocillo 10 μL de suspensión de las células, se seca en estufa a 46 °C durante 10 min, y se deshidrata la muestra de cada pocillo agregando cada 3 min 10 μL de etanol al 50, 80 y 98 %. Por último se seca el portaobjetos a temperatura ambiente, se etiqueta y se almacena a -20 °C.

Hibridación

Previamente se preparan el tampón de hibridación y el tampón de lavado. Se procede a descongelar las sondas de oligonucleótidos que se van a aplicar. Se prepara el cóctel de sondas, teniendo en cuenta que se debe agregar 1 μL de cada sonda y 10 μL de tampón de hibridación por pocillo, se agregan 11 μL del cóctel de sondas en cada pocillo a hibridar (conviene dejar al menos 2 pocillos sin hibridar para contrastar la fluorescencia). Se coloca inmediatamente cada porta objetos en un tubo Falcon para hibridación, agregando previamente en el tubo el resto del tampón de hibridación, los tubos se tapan y sellan con parafilm (para evitar la pérdida por evaporación del tampón de hibridación) y se incuban durante 1,5 horas a 46 °C.

Posterior a la incubación en forma rápida se retiran los portaobjetos del tubo Falcon, procediendo a eliminar el tampón de hibridación lavando con un poco del tampón de lavado, luego se coloca el portaobjetos dentro del tubo Falcon con el tampón de lavado restante y se incuba de 10 - 20 min a 48°C. Por último se retiran los portaobjetos del tubo, lavando con agua MilliQ y dejando secar los portaobjetos al aire. Los portaobjetos se almacenan a 4 °C protegidos de la luz.

Tinción con DAPI

La tinción con DAPI se realiza añadiendo 20 μL de DAPI (Concentración 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a cada pocillo y dejar actuar durante 4 minutos. Posteriormente lavar con agua MilliQ y secar los portaobjetos al aire.

Observación microscópica

Para realizar la observación al microscopio se añaden 4 μL de amplificador de fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories) sobre cada pocillo del portaobjetos. Se coloca a continuación el cubreobjetos, presionando ligeramente con una cartulina de forma que no queden burbujas de aire y se retira el exceso del aceite amplificador de fluorescencia.

Para el análisis de los portaobjetos se ha empleado un microscopio de epifluorescencia (Axioskop 2 plus, Zeiss). Este microscopio es similar al convencional, a excepción de que la luz incidente procede de una lámpara de rayos ultravioleta (UV). Esta luz atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de

onda capaz de excitar al fluorocromo antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. La emisión se produce rápidamente después de la absorción, volviendo el fluorocromo a su estado basal, por lo que el fenómeno de fluorescencia solo tiene lugar mientras dura la iluminación.

En combinación con el microscopio de epifluorescencia se utilizó una cámara digital (Coolsnap, Roper Scientific Photometrics), con la cual se realizaron fotografías digitales para cada filtro utilizado. De este modo se obtienen tres fotografías de la misma muestra, una por cada fluorocromo (FITC, Cy3 y DAPI). Con estas fotografías y un programa de tratamiento de imágenes (PhotoPlus 6.0) se realizaron superposiciones de las distintas imágenes, permitiendo evaluar cualitativamente la abundancia de los microorganismos estudiados.

En la figura 5.3 se muestran fotografías del mismo campo visual utilizando los tres fluorocromos (DAPI, FITC y Cy3). Cada fluorocromo presenta un espectro característico y único de excitación y emisión; por ejemplo, la fluoresceína (FITC) ($\lambda_{exc.} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 519 \text{ nm}$) y la carbocianina (Cy3) ($\lambda_{exc.} = 558 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 670 \text{ nm}$). Además se suele emplear la tinción con el 4,6-diamidino-2-fenilindol diclorohidrato (DAPI) ($\lambda_{exc.} = 359 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 461 \text{ nm}$) para visualizar todas las células de la muestra puesto que es una molécula que se une al ADN presente.

Adicionalmente se utilizó la técnica de microscopía confocal (CLSM) para obtener imágenes de alta resolución de un solo plano o de una secuencia de planos de la biomasa disgregada y marcada con fluorocromos utilizando la técnica FISH.

El equipo empleado es un Microscopio Confocal Espectral TCS-SP2 (Leica) cuyas principales características son:

- Seis líneas láser de excitación: 458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm y 633 nm.
- Rango espectral de detección de 400 - 850 nm
- Adquisición secuencial de hasta 3 canales de detección para fluorescencia y reflexión, y un canal de iluminación transmitida.

La excitación del fluorocromo FITC se realizó con el láser Argón línea 488nm y el rango espectral de detección en la banda 592 a 550 nm. El fluorocromo Cy3 fue excitado con el láser He/Ne línea 543 nm y el rango de detección en la banda 588 a 655 nm.

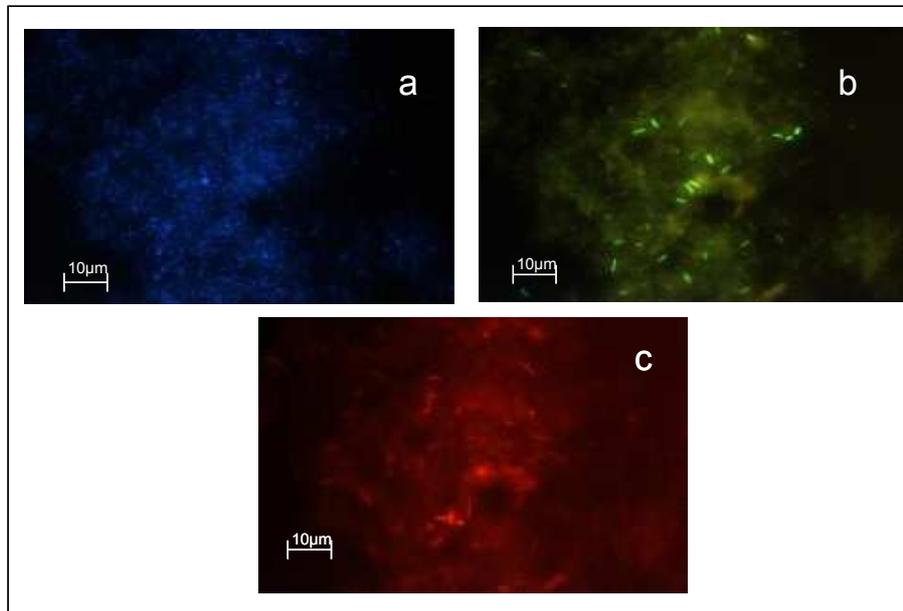


Figura 5.3. Microfotografías utilizando los tres fluorocromos: a) DAPI (azul) indicando todo el DNA, b) FITC (verde) marcando *Eubacterias* y c) Cy3 (rojo) señalando en este caso *Arqueas*

Utilizando el microscopio confocal, se realizaron diez secuencias de imágenes para cada tipo de biomasa disgregada. De cada secuencia se seleccionó la mejor imagen, en la cual se analizaron por separado las áreas marcadas por cada fluorocromo (FITC ó Cy3) con el software de procesamiento de imágenes RS Image. Posteriormente, utilizando una hoja de Excel se calcularon las proporciones relativas en superficie cubierta para los dominios Eubacteria y Arquea. Igual procedimiento se utilizó en la cuantificación relativa de las Arquea específicas: *Methanosaeta* y *Methanobacterium*.

Limitaciones del FISH

La técnica FISH presenta algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta en su aplicación, a continuación se enumeran las más importantes referidas a la aplicación de la técnica en biomasa anaerobia.

Las muestras generalmente presentan una componente importante de autofluorescencia, lo cual dificulta el uso de métodos automáticos de identificación (Karakashev *et al.*, 2005), por lo tanto se requiere un entrenamiento mínimo por parte del observador en la identificación de la fluorescencia.

La observación de microorganismos miembros del orden *Methanobacteriales* es difícil debido a su pequeño tamaño (Karakashev *et al.*, 2005). También se puede dar el caso de que se observe fluorescencia de fondo, que interfiere en la calidad de las imágenes y dificulta la diferenciación entre aquellas bacterias marcadas y las que no lo están. Por último la biomasa anaerobia aún disgregada presenta una estructura filamentosa que dificulta la observación de los microorganismos que presentan fluorescencia.

Crocetti *et al.* (2006), reportan algunas dificultades en la fijación o penetración de las sondas al aplicar la técnica FISH en cultivos puros representativos de la mayoría de familias de los microorganismos metanogénicos. En muestras ambientales se pueden presentar algunos problemas con la autofluorescencia. En la optimización de la técnica recomiendan para las sondas MX825 y MB1174, 50 y 45 % de formamida respectivamente. En este trabajo se utilizó un % de formamida del 45% en ambas sondas.

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Evolución de la biomasa en reactores de laboratorio

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos en reactores de laboratorio sobre los cambios en las características y la distribución de los microorganismos presentes en una biomasa granular desarrollada en reactores UASB, cuando el tipo de sustrato es modificado desde un sustrato simple a un sustrato no acidificado o complejo.

Operación de los reactores

Los reactores se operaron con velocidades de carga orgánica (VCO) de $4,8 \pm 0,9$ kg DQO·m⁻³·d⁻¹ para el reactor alimentado con etanol (RE), de $2,7 \pm 0,8$ kg DQO·m⁻³·d⁻¹ para el reactor alimentado con carbohidratos (RC) y de $2,2 \pm 0,6$ kg DQO·m⁻³·d⁻¹ para el reactor alimentado con proteína hidrolizada (RP). La VCO para los reactores RC y RP se ajustó para evitar problemas de acidificación en RC (pH por debajo de 6,5) e inhibiciones por amonio libre en RP. Las concentraciones promedio de DQO utilizadas fueron 9500, 5700 y 4200 mg DQO·L⁻¹ respectivamente para RE, RC y RP. La Figura 5.4 presenta las cargas orgánicas aplicadas y la eficacia de eliminación de TOC y DQO, para los tres reactores.

El reactor RE presentó valores cercanos al 100 % de eficacia de eliminación de TOC y de DQO durante el período de operación. La eficacia de eliminación de materia orgánica en el reactor RC osciló entre el 80 y 90 % durante los primeros 160 días de operación; posterior a este período dicho reactor presentó una disminución de la eficacia a valores entre 60 y 80 %, coincidiendo con la formación de biomasa floculenta y la expansión del lecho de lodo.

El reactor RP presentó un rango de eficacia similar (80 a 90%). Sin embargo se identifican claramente 4 períodos en los cuales disminuye la eficacia de eliminación de materia orgánica, dichos períodos corresponden con los días 33, 78, 145 y 198 de operación (señalados con flechas en las Figuras 5.4 y 5.5). En los períodos mencionados el reactor RP presentó concentraciones de amonio libre que sobrepasaron la concentración que produce una inhibición por amonio libre. La concentración de inhibición por amonio libre depende de la cantidad de amonio presente en el efluente y de los valores de la temperatura y del pH. En la bibliografía se pueden encontrar relaciones empíricas que permiten calcular la concentración de amonio libre. Una de las más utilizadas es la ecuación de Anthonisen *et al.* (1976), que se presenta en la ecuación 5.1.

$$[NH_3] = (17/14) \cdot [N - total] \cdot 10^{pH} / \left(\exp^{(6344/(273+T))} + 10^{pH} \right) \quad (\text{Ec. 5.1})$$

Evolución de la ecología microbiana y características técnicas de gránulos anaerobios sometidos a diferentes aguas residuales

Siendo:

$[NH_3]$: concentración de amonio libre como NH_3 ($mg \cdot L^{-1}$)

$[N - total]$: concentración de amonio total como N ($mg \cdot L^{-1}$)

T: temperatura ($^{\circ}C$)

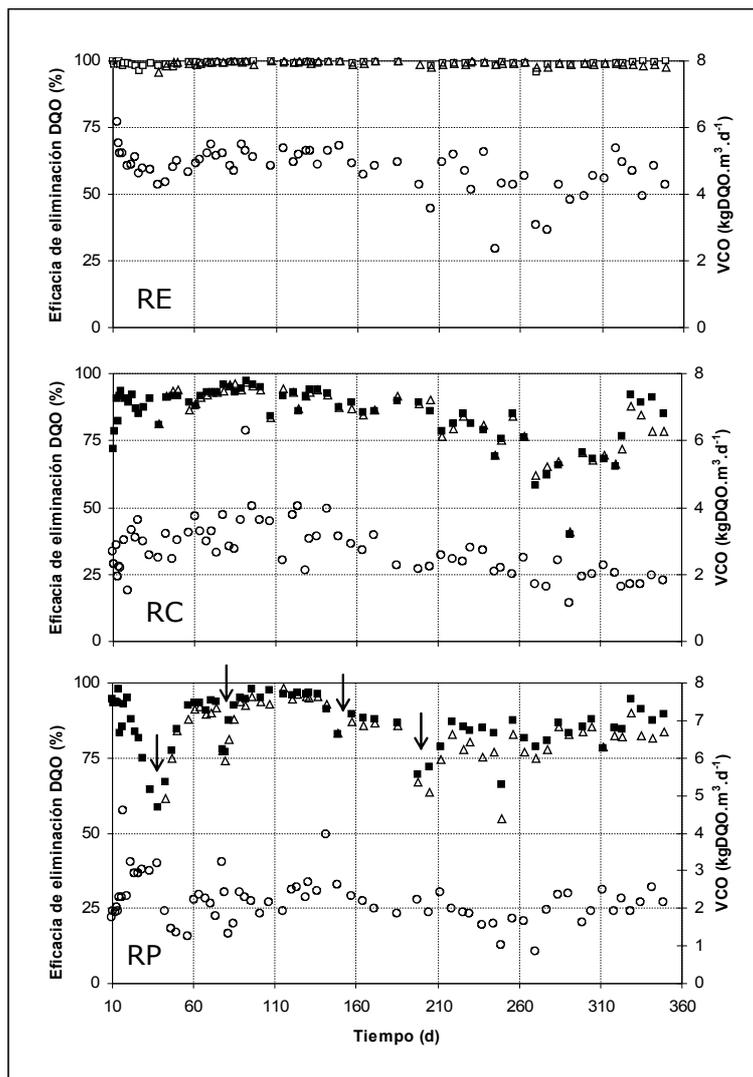


Figura 5.4. Evolución de la VCO (O) y las eficacias de eliminación de DQO (Δ) y TOC (\blacksquare) en los reactores RE, RC y RP.

Operando a una temperatura de 37 °C y un pH de 7,8, se presentó inhibición, a partir de concentraciones de amonio total de aproximadamente 750 mg·L⁻¹, para dichas condiciones la concentración de amonio libre (amonio no ionizado), estimada por la ecuación de Anthonisen *et al.* (1976), es de 75 mg·L⁻¹, correspondiente al 10% del amonio total y similar a la reportada como concentración inhibitoria de la metanogénesis (Speece, 1996).

La Figura 5.5 presenta para el reactor RP la eficacia de eliminación de DQO y las concentraciones en el efluente de nitrógeno amoniacal (NNH₄⁺) y ácido acético, se identifican claramente los eventos de inhibición cuando la concentración de amonio en el reactor sobrepasa el límite de 750 mg·L⁻¹, con el consecuente aumento de la concentración de ácido acético en el efluente a valores entre 600 y 900 mg·L⁻¹.

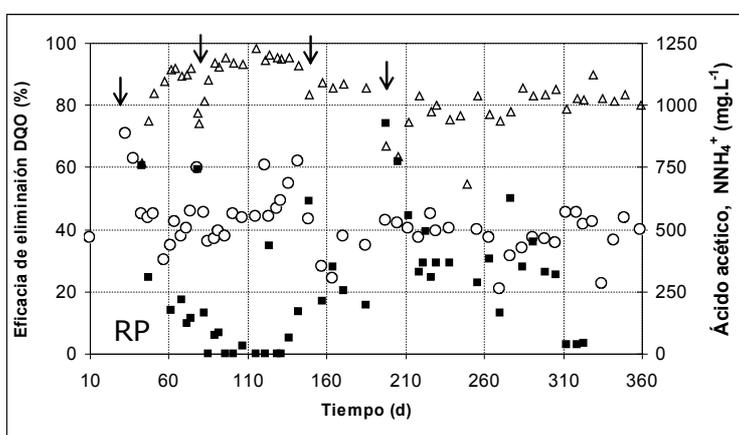


Figura 5.5. Eficacia de eliminación de DQO (Δ), concentraciones de NNH_4^+ (\circ) y ácido acético (\blacksquare), en el efluente del reactor RP.

Cantidad y composición química de la biomasa

En la Tabla 5.4 se presenta la evolución en temporal de la cantidad de biomasa y de la relación SSV/SST para los reactores RE, RC y RP. En el reactor RE la cantidad de biomasa aumentó gradualmente desde el valor inicial inoculado de 50 g de SSV hasta un valor final de 75,5 g de SSV.

El reactor RC presentó expansión del lecho, flotación y pérdida de biomasa a partir del día 160 de operación; por esta razón la concentración de SSV presenta un valor bajo el día 171. En el reactor RP se realizó una purga de biomasa el día 250 de operación, lo cual explica el valor de 47,4 g de SSV al finalizar el experimento. La relación SSV/SST presentó valores muy similares en los tres reactores. Al finalizar el experimento el reactor RP mostró la relación más alta con valor de 0,94.

Evolución de la ecología microbiana y características técnicas de gránulos anaerobios sometidos a diferentes aguas residuales

Tabla 5.4. Evolución de la cantidad de biomasa y de la relación SSV/SST en los reactores RE, RC y RP.

Tiempo de operación (días)	RE		RC		RP	
	SSV(g)	SSV/SST	SSV(g)	SSV/SST	SSV(g)	SSV/SST
67	59.2	0.89	44.6	0.90	58.7	0.93
171	61.3	0.90	40.4	0.89	60.1	0.94
365	75.5	0.90	55.6	0.87	47.4	0.94

En los días 171 y 365 de operación se realizó el análisis de composición elemental de la biomasa de los tres reactores y los resultados se muestran en la Tabla 5.5, observándose en dicha tabla un contenido menor de nitrógeno para la biomasa del reactor RC y, por tanto, una relación carbono/nitrógeno (C/N) más alta que la encontrada en la biomasa de los reactores RE y RP. Posiblemente este hecho esté relacionado con la acumulación de polímeros extracelulares (EPS), específicamente polisacáridos extracelulares, producidos por las bacterias acidogénicas en el reactor RC alimentado con carbohidratos (Grotenhuis *et al.*, 1991c); aunque otros autores han reportado mayor contenido de proteínas que de polisacáridos en los polímeros extracelulares (Schmidt and Ahring, 1994). La relación carbono /nitrógeno para los gránulos de los reactores RE y RP son similares.

Tabla 5.5. Composición elemental (% en peso / peso seco) y relación C/N en la biomasa de los reactores RE, RC y RP.

Elemento	RE		RC		RP	
	171 días	365 días	171 días	365 días	171 días	365 días
Nitrógeno (%)	10,5	10,8	8,7	9,0	10,3	10,2
Carbono (%)	51,4	48,6	48,7	47,0	49,1	48,9
Hidrógeno (%)	8,0	7,0	6,6	7,0	8,1	7,3
Relación C/N	4,9	4,5	5,6	5,3	4,8	4,8

La Tabla 5.6 presenta la composición mineral de la biomasa de los reactores RE, RC y RP a los 365 días de experimentación. La biomasa desarrollada con etanol y proteína hidrolizada presentan un contenido mayor de minerales, con valores de 4,4% y 4,1% (RE y RP respectivamente), para la suma del porcentaje en peso de los minerales analizados; en la biomasa de los tres reactores los elementos más abundantes son fósforo, calcio y azufre, lo cual concuerda con lo encontrado por Wu *et al.* (1991); Uemura and Harada (1995); Gonzalez-Gil *et al.* (2001b); Batstone and Keller (2001).

Capítulo 5

Tabla 5.6. Composición mineral (% en peso / peso seco) de la biomasa de los reactores RE, RC y RP al finalizar la experimentación (365 días de operación).

Reactor	Elemento						Suma
	P	Ca	S	K	Fe	Mg	
RE	1,58	0,47	0,89	0,67	0,23	0,55	4,4
RC	0,93	0,52	0,64	0,30	0,19	0,07	2,7
RP	1,36	1,04	0,86	0,22	0,46	0,20	4,1

Densidad y características de sedimentación

En la Tabla 5.7 se muestran los valores para la densidad de la biomasa granular a los 137 y 365 días de operación. Las densidades presentan valores similares para las tres biomásas a los 137 días de operación. Sin embargo al finalizar la experimentación se detectaron diferencias importantes en este parámetro observando que los gránulos del reactor RC presentan la densidad menor, concordando con los problemas de expansión del lecho y lavado del lodo que presentó este reactor. Por su parte la biomasa de los reactores RE y RP presentan valores de densidad altos, siendo la biomasa alimentada con etanol la que posee el valor más alto.

La composición mineral de la biomasa influye directamente en propiedades físicas como la densidad y por ende en la velocidad de sedimentación de los gránulos (Pereboom, 1994; Batstone and Keller, 2001); la composición mineral obtenida a los 365 días de operación guarda una clara relación con las densidades medidas en los gránulos; la biomasa de los reactores RE y RP que presentan los mayores valores en la suma de minerales analizados, presentan a su vez los valores más altos de densidad. De otro lado la biomasa del reactor RC que presenta el contenido mineral más bajo, presenta consecuentemente el valor de densidad más bajo.

Tabla 5.7. Densidad específica de la biomasa por reactor a los 137 y 365 días de operación.

Reactor	Densidad específica (g·L ⁻¹)	
	137 días de operación	365 días de operación
RE	43,3	71,5
RC	44,5	37,1
RP	49,6	59,5

En la Tabla 5.8 se presentan los valores de la velocidad de sedimentación (Vs) y el índice volumétrico de lodos (IVL) para la biomasa inicial inoculada y la biomasa de los reactores RE, RC y RP a los 137 y 365 días de operación. La biomasa inicial presenta tanto para la Vs como para el IVL valores correspondientes a una biomasa granular con buena sedimentación y compactación.

Evolución de la ecología microbiana y características técnicas de gránulos anaerobios sometidos a diferentes aguas residuales

Tabla 5.8. Evolución de la velocidad de sedimentación (V_s) e índice volumétrico de lodos (IVL).

Biomasa por agua residual tipo	Inicial		137 días de operación		365 días de operación	
	V_s ($m \cdot h^{-1}$)	IVL ($ml \cdot g^{-1}$)	V_s ($m \cdot h^{-1}$)	IVL ($ml \cdot g^{-1}$)	V_s ($m \cdot h^{-1}$)	IVL ($ml \cdot g^{-1}$)
Etanol			42,1	39,3	50,0	20,2
Carbohidratos	26,5	22,8	40,7 6,5*	56,7	31,0	43,5
Proteínas			42,5	38,0	37,2	24,6

* Lodo floculento

A los 137 días los valores de V_s son similares para la biomasa granular de los tres reactores, sin embargo en el reactor RC se detectó la presencia de lodo floculento con una V_s significativamente más baja ($6,5 m \cdot h^{-1}$) que la V_s de la biomasa granular para el mismo reactor ($40,7 m \cdot h^{-1}$). La presencia de biomasa floculenta en el reactor RC incide también en el valor del IVL, el cual toma un valor de $56,7 ml \cdot g^{-1}$ superior a los valores de IVL para los reactores RE y RP ($39,3$ y $38 ml \cdot g^{-1}$ respectivamente).

Cumplidos los 365 días de operación, la biomasa del reactor RE presenta el mayor valor de V_s ($50 m \cdot h^{-1}$) mientras que la biomasa del RC muestra la V_s menor ($31 m \cdot h^{-1}$). Consecuentemente en el reactor RE se observa un menor valor del IVL, de $20,2 ml \cdot g^{-1}$, mientras que la biomasa del reactor RC presenta un IVL de $43,5 ml \cdot g^{-1}$, lo cual indica que los gránulos del reactor RC son menos densos y compactos que los gránulos del reactor RE. Los valores encontrados para la densidad a los 365 días confirman este hecho.

La biomasa del reactor RP presenta a los 365 días de operación, un valor para la V_s de $37,2 m \cdot h^{-1}$, similar al medido a los 137 días de operación para la misma biomasa. El IVL para esta biomasa toma un valor de $24,6 ml \cdot g^{-1}$, lo que indica una buena compactación. Los valores de V_s e IVL encontrados en la biomasa de RP, valores superiores a los determinados para la biomasa de RC, están relacionados también con los mayores valores encontrados para la densidad y contenido de minerales presentes en la biomasa de RP.

Morfología y distribución por tamaño

En la Figura 5.6 se muestra la evolución temporal del valor del diámetro promedio en los tres reactores. La biomasa granular presentó un aumento importante del diámetro promedio durante los experimentos con los tres reactores. El aumento de tamaño en los gránulos de los reactores RC y RP es mayor que en el reactor RE.

La Figura 5.7 presenta la distribución de tamaños inicial y final de los gránulos en la biomasa de los tres reactores,. En los tres casos, se puede observar una transición desde una distribución sesgada a la derecha con dominio de gránulos de tamaño menor a 1 mm a distribuciones de tipo normal con diámetros promedio mayores de 2 mm.

El aumento del diámetro promedio en los gránulos del reactor RE, teniendo en cuenta que no hubo cambio de sustrato para esta biomasa, puede estar relacionada con el cambio de configuración del reactor de laboratorio UASB con respecto a la planta piloto USBF (UASB+AF) de donde se tomó el inóculo.

El filtro existente en la parte superior del reactor UASB en la planta piloto atrapa la biomasa granular fina y la biomasa floculenta, mientras que la biomasa de menor tamaño puede lavarse en el reactor UASB utilizado en el laboratorio. En los reactores UASB de laboratorio, el lavado de la biomasa fina aparentemente ocurrió antes del día 99 de experimentación de acuerdo con la Figura 5.6, en la cual puede observarse que el diámetro promedio para la biomasa granular de RE aumentó entre el inicio del experimento y el día 99 y luego se estabilizó hasta el final del experimento.

En contraste el diámetro promedio de la biomasa en los reactores RC y RP continuó aumentando hasta finalizar el experimento. De esta manera el aumento en el diámetro promedio y el cambio en la distribución por tamaño en los reactores RC y RP son resultantes del fenómeno combinado de la colonización por nueva biomasa y del lavado de los gránulos más finos presentes en el inóculo.

En la Figura 5.8 se presentan fotos de los gránulos de los tres reactores para el día 365. Los gránulos del reactor RC presentan una coloración clara (blancuzca) y crecimiento de biomasa tipo esponjoso a su alrededor. En los gránulos del reactor RP se observa también el crecimiento de nueva biomasa de un color más claro, recubriendo los gránulos originales, mientras que los gránulos del reactor RE tienen un color oscuro y no tiene lugar el fenómeno de crecimiento de biomasa esponjosa sobre su superficie.

Una explicación para este comportamiento sería la existencia de una relación entre la coloración de los gránulos del reactor RC alimentado con carbohidratos con la relación C/N mayor que presentan dichos gránulos en comparación con la biomasa desarrollada en los reactores RE y RP. La coloración blancuzca de los gránulos del reactor RC, estaría entonces relacionada con la presencia de una mayor cantidad de polisacáridos extracelulares recubriendo la superficie de dichos gránulos.

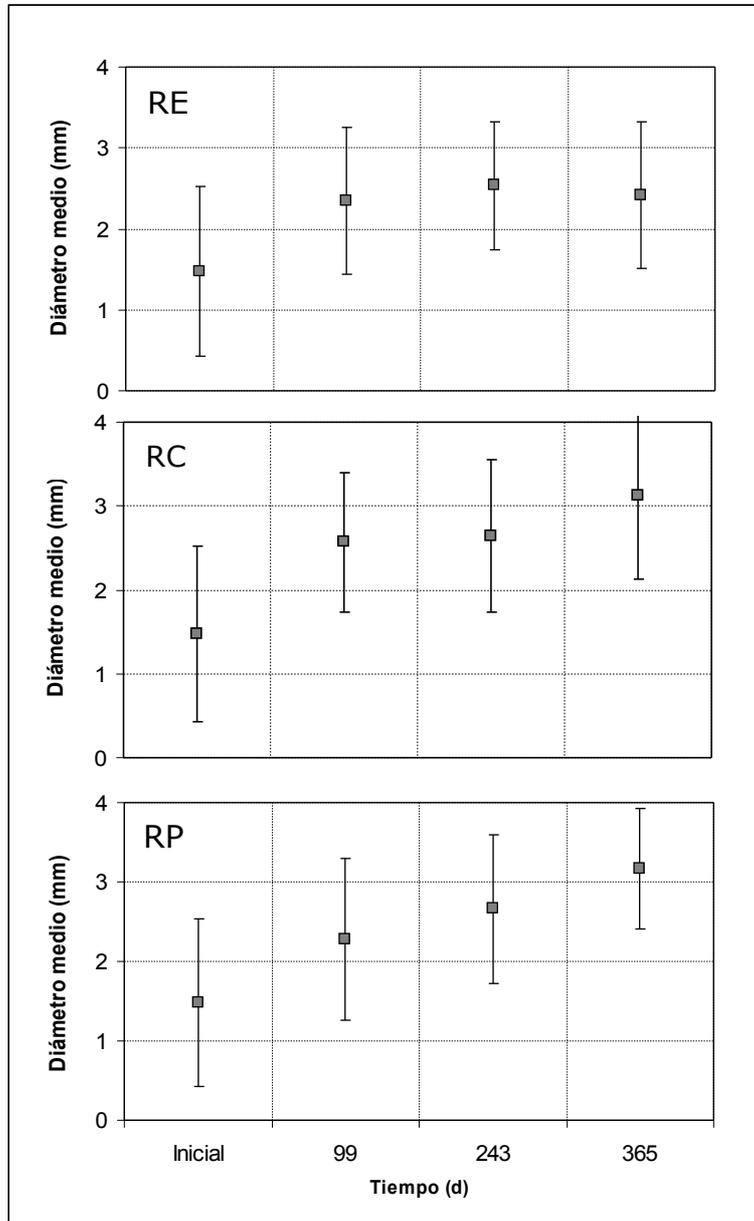


Figura 5.6. Evolución del diámetro promedio en la biomasa granular de los tres reactores.

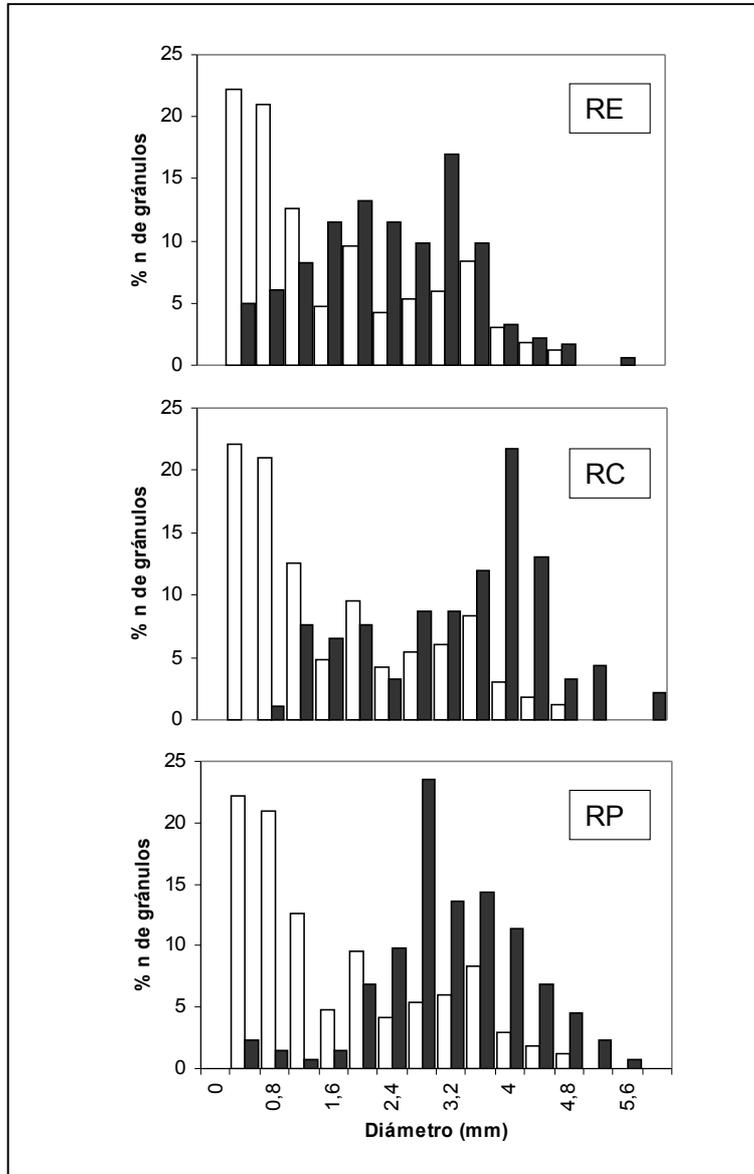


Figura 5.7. Distribución por tamaño inicial (□) y final (■) en los tres reactores.

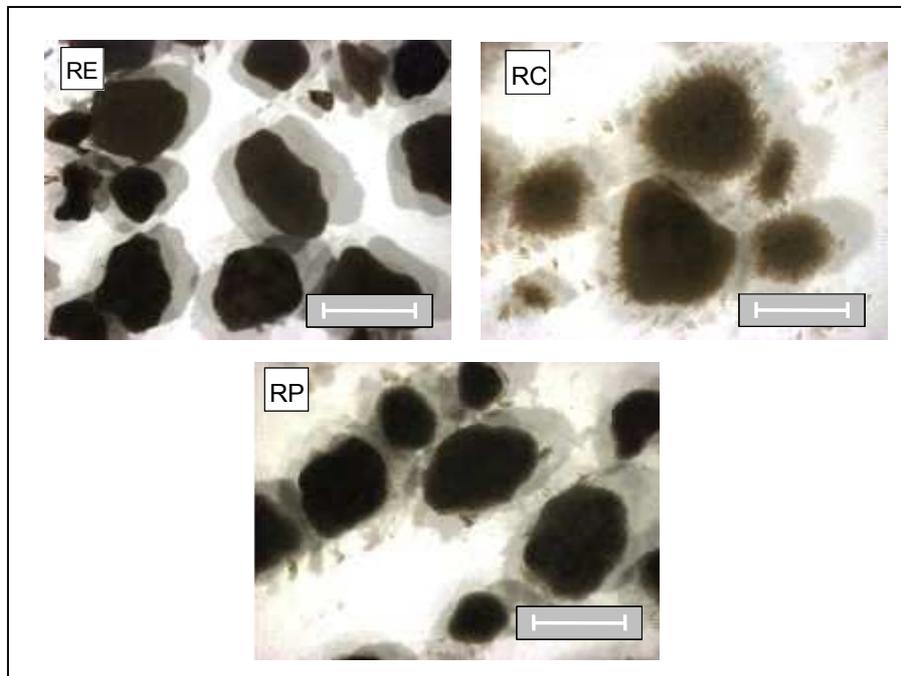


Figura 5.8. Aspecto de la biomasa granular a los 365 días de operación para los tres reactores; la barra corresponde a una longitud de 2 mm.

Actividad acidogénica específica (AAE)

En la Figura 5.9 puede observarse la evolución de la actividad acidogénica específica (AAE) para los tres reactores. Al final de la experimentación (365 días), el reactor RC presenta el valor más alto (32 ± 2 g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹), el reactor RP muestra un valor intermedio (25 ± 5 g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹) y, por último, el reactor RE presenta el valor más bajo (15 ± 3 g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹). En los tres reactores la Actividad Acidogénica Específica aumentó, de una manera importante, con respecto al valor correspondiente a la biomasa inoculada al inicio (9 ± 1 g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹). Claramente los valores de la AAE están relacionados con el tipo de sustrato. Así el reactor RC, alimentado con dextrina, presenta el mayor valor como respuesta a un sustrato no acidificado tipo carbohidratos, que requiere el desarrollo de una población importante de bacterias acidogénicas.

Este desarrollo es rápido, si se observa la Figura 5.9; el reactor RC a los 67 días de experimentación presenta una actividad acidogénica específica de 28 ± 2 g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹, similar a la AAE final de la biomasa en dicho reactor. Conviene recordar en este punto que la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) de las bacterias acidogénicas para el sustrato glucosa es muy alta, del orden de 7 a 20 d⁻¹ (Batstone *et al.*, 2002). La presencia de gran cantidad de biomasa acidogénica

en el reactor RC también tiene relación con características ya discutidas como la densidad, la velocidad de sedimentación y el índice volumétrico de lodos así como con la presencia de lodo floculento y la expansión del lecho de lodo detectados en el reactor RC a partir del día 160 de operación.

Actividad metanogénica específica (AME)

La Tabla 5.9 presenta la evolución de la actividad metanogénica específica durante el tiempo de experimentación. Tal como se describe en el apartado 2.1.3 del capítulo 2 se realizaron los ensayos por triplicado utilizando como sustratos etanol, acetato y una mezcla H₂/CO₂ (80/20). El sustrato acetato permite evaluar la actividad de los microorganismos metanogénicos acetoclásticas, la mezcla H₂/CO₂ se utiliza para medir la actividad de los microorganismos metanogénicos hidrogenófilos y por último el sustrato etanol permite evaluar la actividad de ambos.

Tabla 5.9. Evolución de la actividad metanogénica específica (AME) para la biomasa de los tres reactores. (g DQO-CH₄·g SSV⁻¹·d⁻¹).

Reactores	Sustratos	Tiempo (días)			
		Inicial	67	243	365
RE	Acetato	0,85±0,02	0,63±0,11	0,68±0,18	0,86±0,10
	Etanol	0,97±0,11	0,74±0,07	0,72±0,09	0,83±0,26
	H ₂ /CO ₂	1,07±0,11	1,00±0,13	1,18±0,24	1,10±0,20
RC	Acetato	0,85±0,02	0,65±0,13	0,85±0,06	0,72±0,08
	Etanol	0,97±0,11	0,69±0,01	0,51±0,06	0,84±0,35
	H ₂ /CO ₂	1,07±0,11	1,66 ±0,25	2,06±0,09	1,87±0,04
RP	Acetato	0,85±0,02	0,65±0,10	0,47±0,12	0,57±0,06
	Etanol	0,97±0,11	0,66±0,08	0,55±0,09	0,62±0,09
	H ₂ /CO ₂	1,07±0,11	0,84±0,27	1,47±0,32	1,52±0,36

La Figura 5.10 ilustra para cada reactor los cambios en la AME durante el tiempo de experimentación. El reactor RE presenta para los tres sustratos utilizados un comportamiento estable en la actividad metanogénica específica durante toda la operación. En el reactor RC la AME para los sustratos acetato y etanol presenta una disminución leve, sin embargo para el sustrato H₂/CO₂ la actividad metanogénica específica casi se duplica, pasando de una actividad inicial de 1,07 a 1,87 g DQO-CH₄·g SSV⁻¹·d⁻¹ al finalizar el experimento. Este hecho esta relacionado con la mayor disponibilidad de H₂ y CO₂ generados en la acidificación de la dextrina utilizada como sustrato rico en carbohidratos.

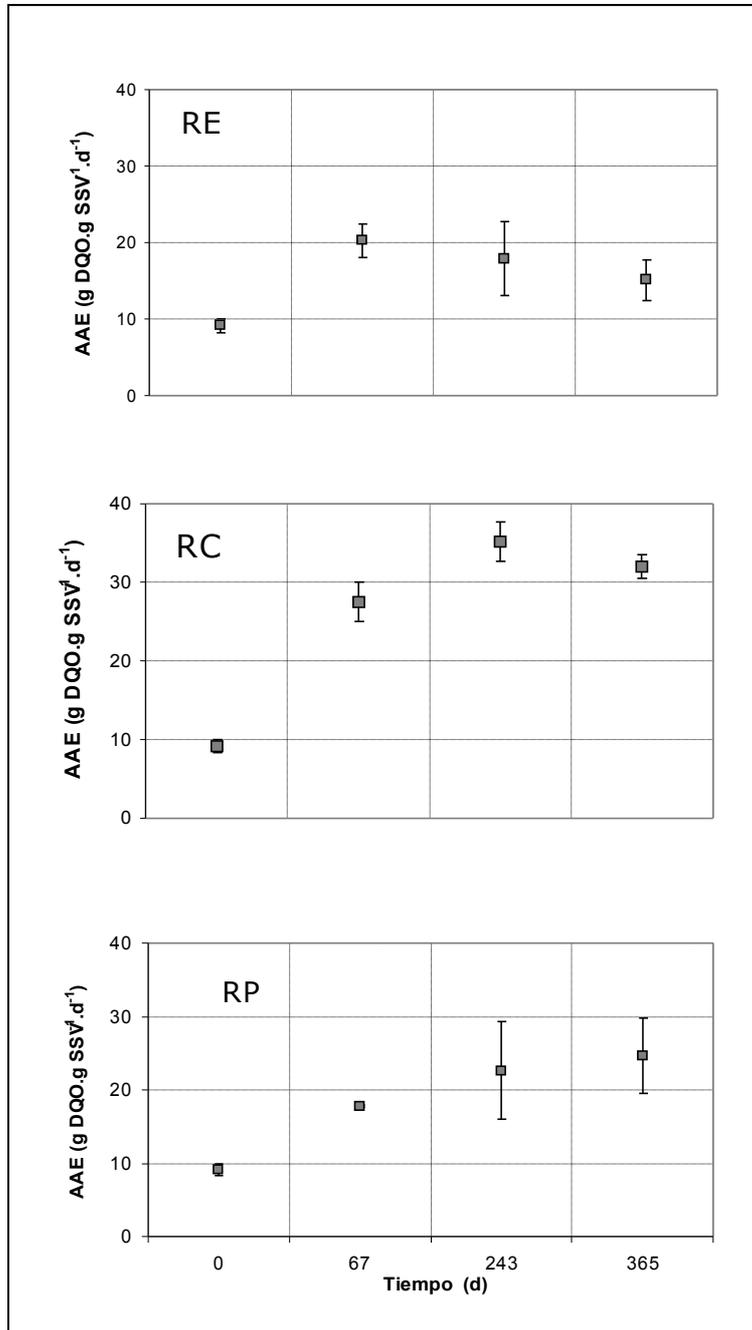


Figura 5.9. Evolución de la actividad acidogénica específica (AAE).

El reactor RP muestra una disminución de la AME importante para los sustratos acetato y etanol, mientras que se observa un aumento de aproximadamente un 50 % en la AME con el sustrato H₂/CO₂; aumento relacionado con el sustrato de proteína hidrolizada que requiere la etapa de acidificación y, por tanto, genera condiciones adecuadas para el desarrollo de microorganismos metanogénicos hidrogenófilos.

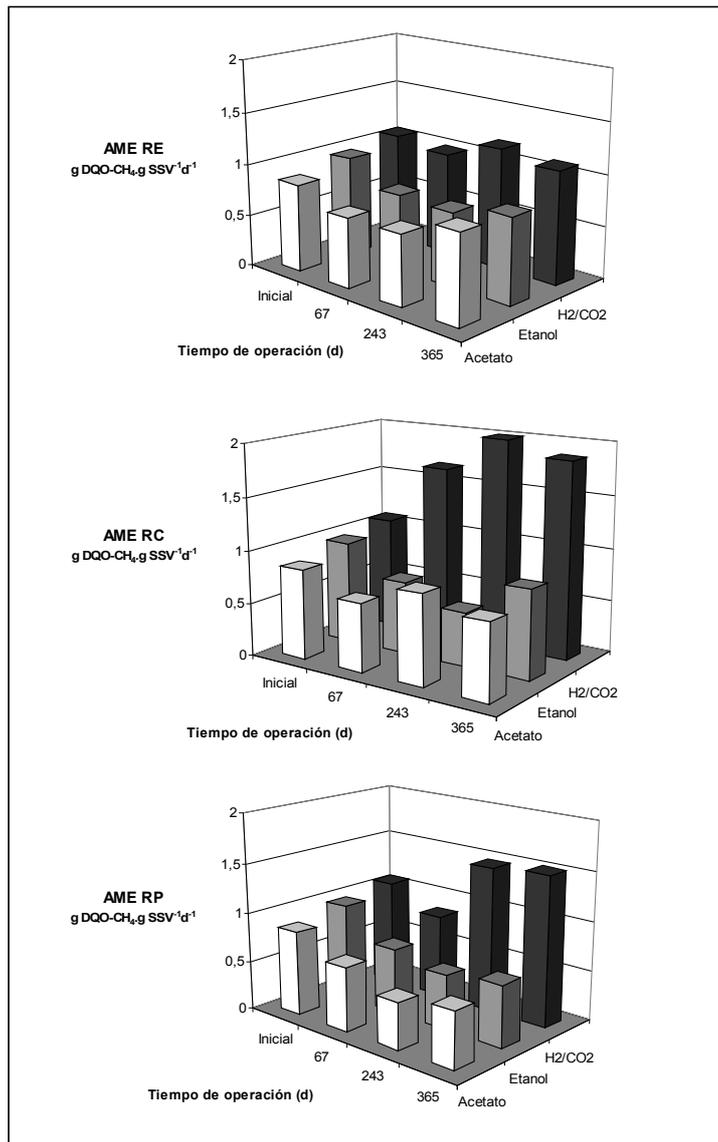


Figura 5.10. Evolución de la actividad metanogénica específica (AME).

Morfología de los microorganismos (SEM)

Al finalizar la experimentación en los reactores de laboratorio, se observó la morfología de los microorganismos presentes en la biomasa de cada reactor mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En la observación de los gránulos se utilizaron dos aproximaciones, una visión de conjunto de los gránulos intentando identificar características generales y las imágenes de detalle mostrando la morfología de los microorganismos presentes. En la Figura 5.11 se presenta la visión de conjunto del gránulo para cada reactor.

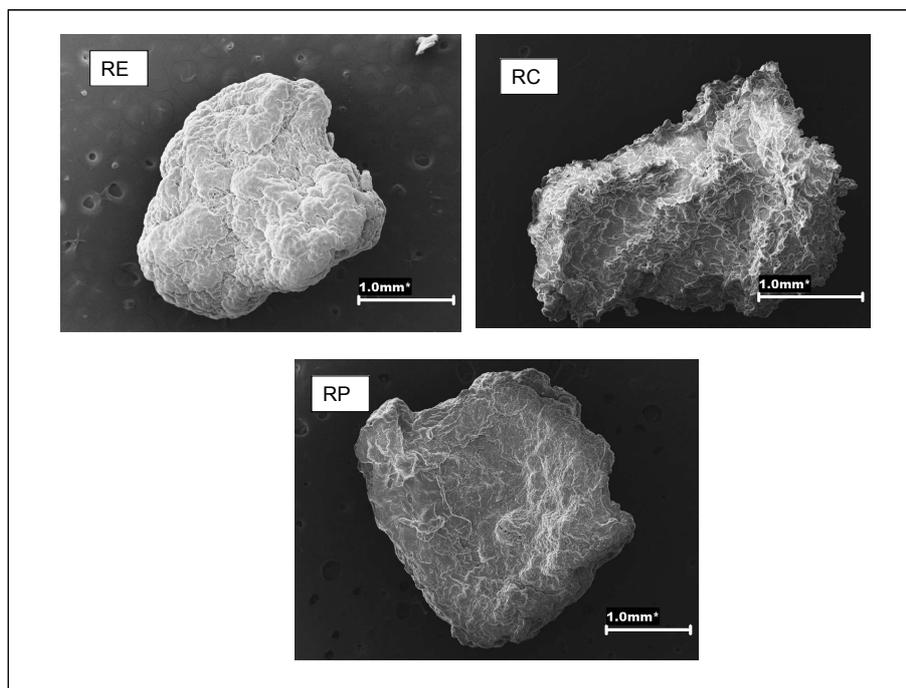


Figura 5.11. Fotos SEM de los gránulos formados en los reactores RE, RC y RP (deshidratación con alcohol).

Los gránulos desarrollados en el reactor RC sufren un mayor colapso al ser deshidratados con alcohol. Este fenómeno se debe a la textura esponjosa que presentan dichos gránulos. Los gránulos formados en el reactor RE muestran una apariencia tipo coliflor que hace mayor su área superficial. Los gránulos del reactor RP presentan una apariencia similar a los del reactor RA.

Posteriormente se realizaron observaciones sobre gránulos deshidratados con alcohol según el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2). En estos gránulos se detectó el recubrimiento de la superficie de la biomasa con una película

aparentemente formada por polímeros extracelulares. La Figura 5.12 presenta la apariencia de la superficie de los gránulos para los reactores RE, RC y RP.

Dicha película presenta un mayor espesor en los gránulos del reactor RC y debido a este recubrimiento es imposible identificar la morfología de los microorganismos. Este mayor espesor de la película en los gránulos del reactor RC coincide con la observación de una coloración diferente (blancuzca) así como con la mayor relación C/N que presentan dichos gránulos comparados con los gránulos provenientes de los reactores RE y RP.

En los gránulos del reactor RP el espesor de la película es menor y en los gránulos del reactor RE el espesor la película es todavía mucho menor y permite identificar la morfología de los diferentes microorganismos (bacilos, cocos y estructuras filamentosas)

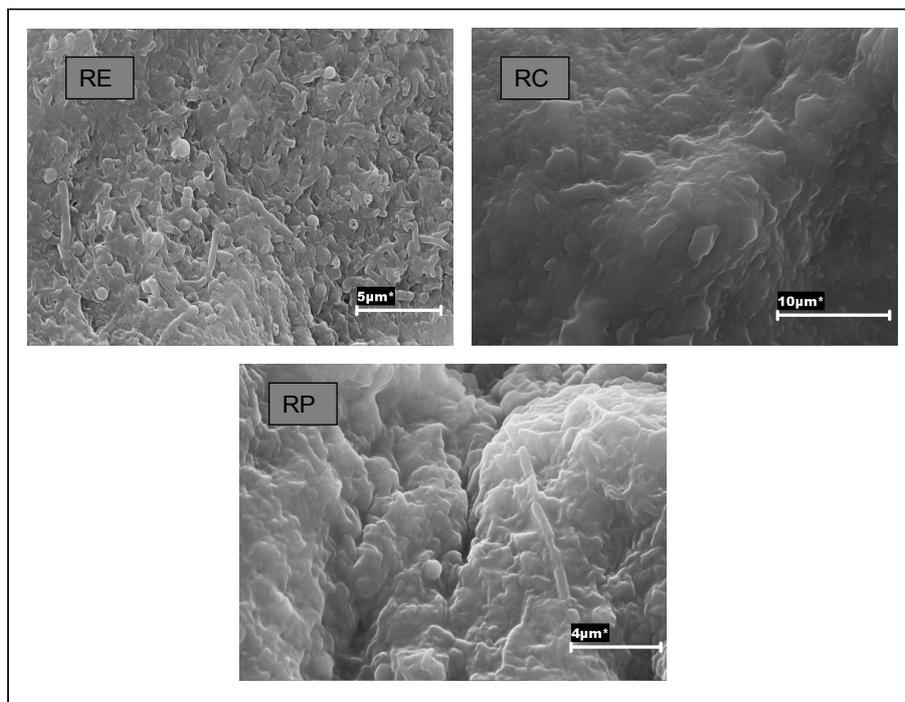


Figura 5.12. Fotos SEM de la superficie de los gránulos formados en los reactores RE, RC y RP (deshidratación con alcohol).

Para mejorar la visión de la superficie del gránulo se procedió a realizar la etapa de deshidratación utilizando acetona y posterior secado por punto crítico. De esta manera se logró la eliminación parcial de la película superficial, obteniendo imágenes de mayor calidad, que permiten identificar y diferenciar la morfología de

los microorganismos presentes. La Figura 5.13 muestra el aspecto de la superficie de gránulos formados en los reactores RE, RC y RP; tras el procedimiento mencionado antes.

En la Figura 5.13 se pueden observar la morfología de los microorganismos presentes en la superficie de los gránulos de los reactores RE, RC y RP. En los tres casos la superficie está formada por una masa compacta de microorganismos en la que predominan formas filamentosas (matriz) en combinación con algunos microorganismos que presentan formas de bacilos y cocos.

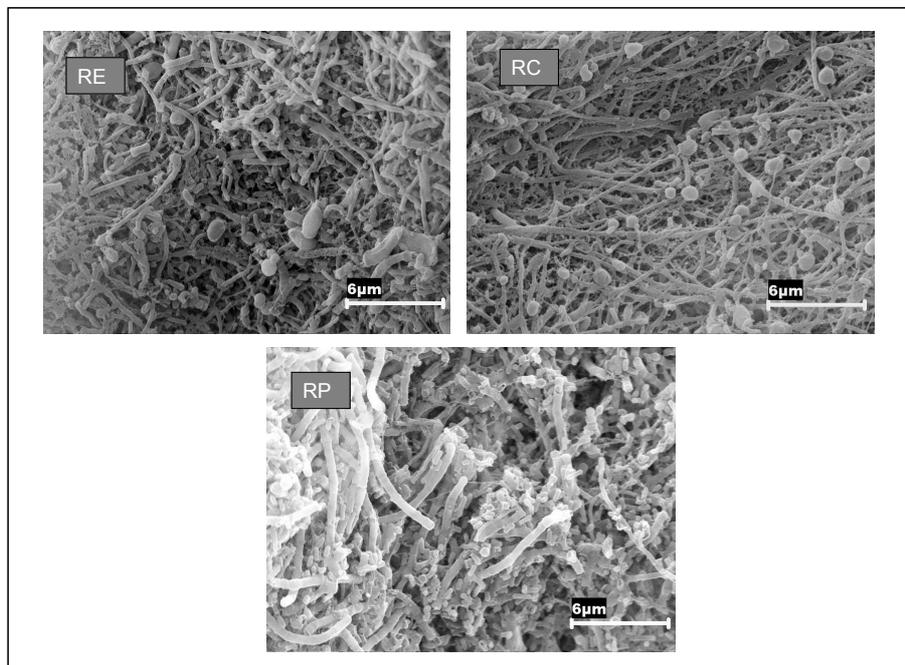


Figura 5.13. Fotos SEM de la superficie de los gránulos formados en los reactores RE, RC y RP (deshidratación con acetona).

En los tres tipos de gránulos, una vez realizada la deshidratación con acetona y el secado por punto crítico se procedió a fracturar algunos gránulos con el objetivo de observar la morfología de los microorganismos presentes en la zona interna y de analizar la estructura general del gránulo.

La Figura 5.14 presenta la sección de un gránulo típico del reactor RE. En la imagen del gránulo completo se diferencia una región central del gránulo (núcleo) y una región externa. La fotografía A muestra la zona más externa del gránulo, en

ella se visualiza un entramado de microorganismos filamentosos similares a *Methanosaeta* y algunos microorganismos con morfología bacilar.

La fotografía B corresponde a la frontera entre el núcleo y la zona externa; en ella pueden observarse microorganismos de forma filamentososa, bacilar y cocos agrupados en racimos que podrían ser *Methanosarcina* (una de estas agrupaciones se señala con una flecha en la fotografía). En la fotografía C, localizada en el centro del núcleo, muestra una estructura más porosa, con presencia de detritus y algunos microorganismos con forma de cocos y bacilos.

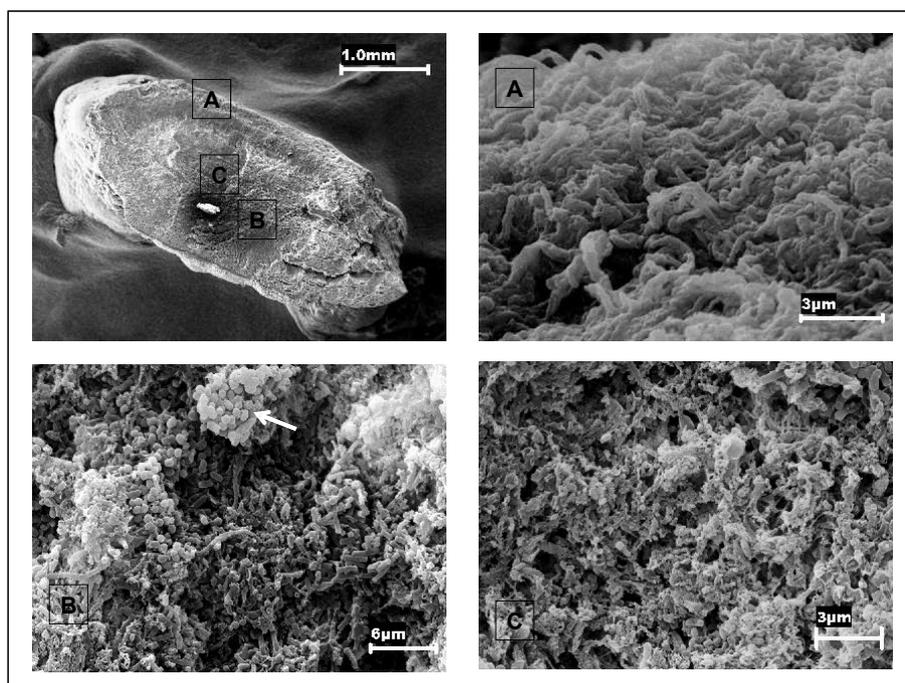


Figura 5.14. Fotos SEM de un gránulo fracturado del reactor RE, identificando el borde externo (A), el límite entre el núcleo y la zona externa (B) y el centro del gránulo (C).

En la Figura 5.15 se puede observar la estructura de un gránulo proveniente del reactor RC. La fotografía A, que corresponde al borde externo presenta un entramado dominado por microorganismos filamentosos y algunos bacilos y de cocos. En la zona intermedia del gránulo, mostrada en la fotografía B, dominan también los microorganismos filamentosos mezclados con algunos microorganismos con morfología bacilar y de cocos. A diferencia del gránulo proveniente de RE, no se observan colonias de cocos en forma de racimos.

En la zona central del gránulo, mostrada en la fotografía C de la Figura 5.15, se observa la presencia de bacilos y cocos mezclados con detritus. Aparentemente en el centro del gránulo originario del reactor RC existe una mayor presencia de microorganismos vivos lo cual puede relacionarse con la estructura esponjosa de dicho gránulo, lo que permitiría la difusión de sustratos y nutrientes hasta el centro del gránulo.

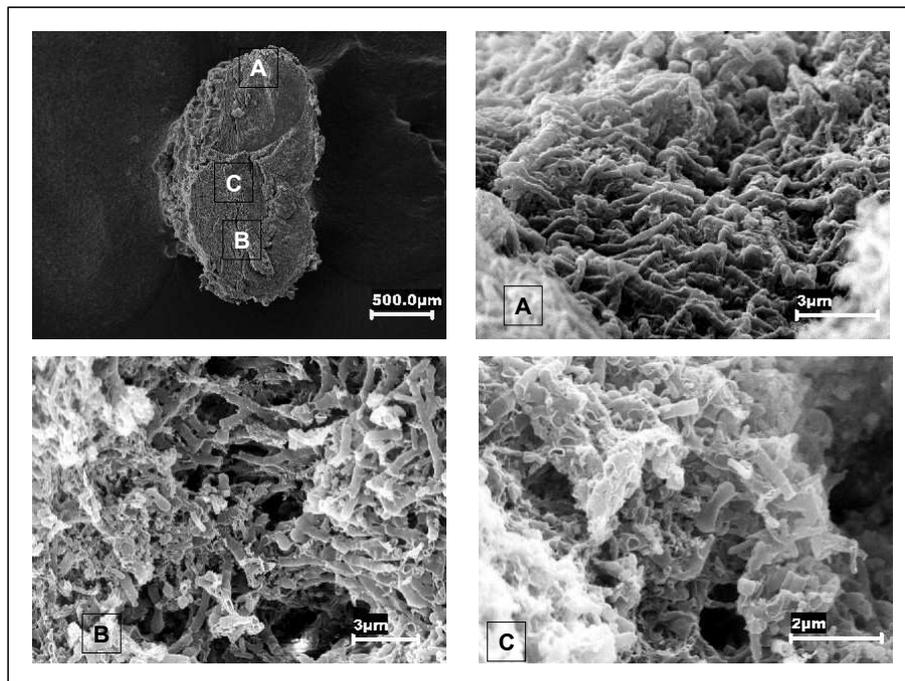


Figura 5.15. Fotos SEM de un gránulo fracturado del reactor RC, identificando el borde externo (A), zona intermedia (B) y el centro del gránulo (C).

En la Figura 5.16 se presentan imágenes de un gránulo fracturado proveniente del reactor RP. En las fotografías A y B, correspondientes a la zona externa e intermedia del gránulo, se puede identificar el dominio de microorganismos con forma de bacilos; diferenciándose este tipo de gránulo de los gránulos originados en los reactores RE y RC, en los que predominaban los microorganismos filamentosos.

En el centro del gránulo del reactor RP, fotografía C, se observa la presencia de numerosas células vacías y detritus, coincidiendo con lo observado en el gránulo del reactor RE. Lo cual indica que existen limitaciones en la difusión de sustratos y nutrientes en la zona central de los gránulos que presentaron mayor compactación y densidad.

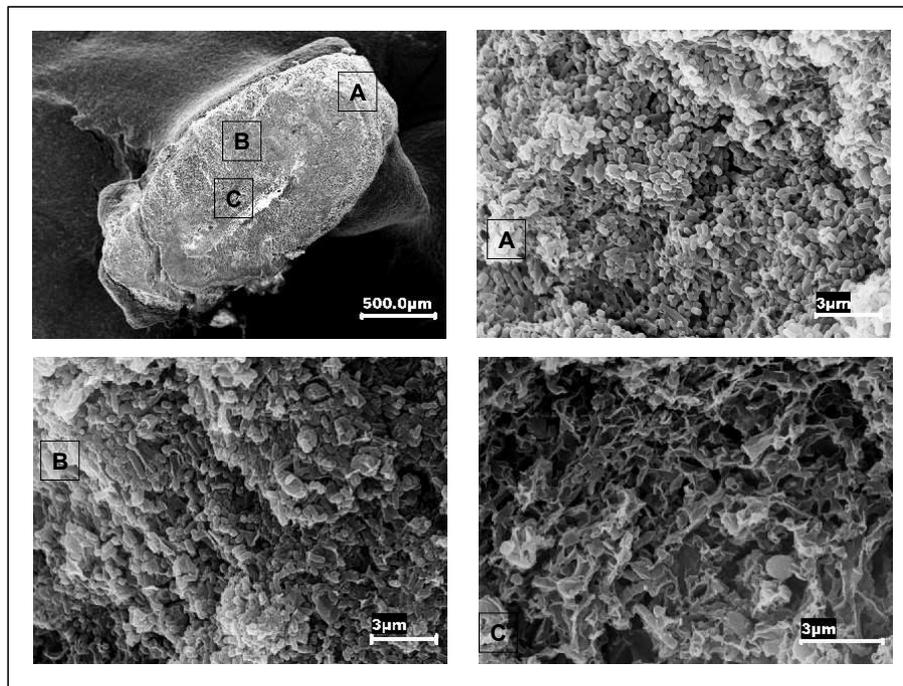


Figura 5.16. Fotos SEM de un gránulo fracturado del reactor RP, identificando el borde externo (A), zona intermedia (B) y el centro del gránulo (C).

Composición microbiológica

Con la finalidad de realizar la cuantificación relativa de los principales microorganismos presentes en la biomasa se utilizó en muestras de biomasa disgregada, la técnica FISH combinada con observaciones a través de microscopía confocal. La Figura 5.17 muestra el tipo de imágenes registradas por el microscopio confocal, para un mismo campo visual; utilizando el fluorocromo FITC para marcar el dominio Bacteria y el fluorocromo Cy3 para marcar el dominio Arquea.

De acuerdo con lo expuesto en el apartado 5.2.3 se analizaron 10 imágenes, cada una perteneciente a secuencias localizadas en sitios diferentes. Posteriormente utilizando análisis de imágenes se procedió a cuantificar el área ocupada por cada dominio como una aproximación cuantitativa de su presencia en los diferentes lodos granulares estudiados. Por último se estimó tanto para Bacteria como para Arquea el área relativa ocupada, utilizando dicha información como un indicador de los cambios en dichas poblaciones. En la tabla 5.10 se presentan los resultados de dicha cuantificación.

Como es obvio los resultados de esta cuantificación relativa de superficies ocupadas por Bacteria y Arquea no son comparables con los resultados de otros estudios que realizan la cuantificación utilizando el recuento de células.

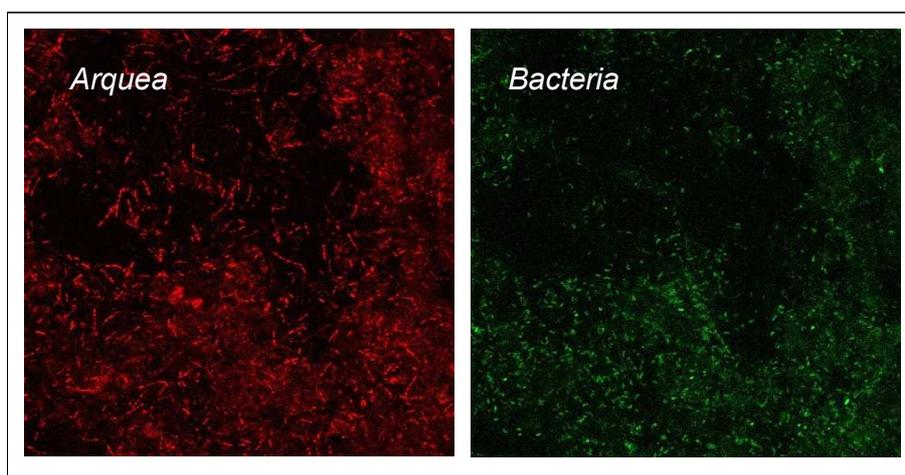


Figura 5.17. Fotos microscopía confocal (CLSM) identificando los dominios *Arquea* (Cy3) y *Bacteria* (FTIC).

En la Tabla 5.10 se observa una proporción relativa similar entre los dominios Arquea y Bacteria en todas las biomásas provenientes de los reactores de laboratorio; el dominio Arquea presenta entre 55 y 60 % y el dominio Bacteria entre 40 y 45%. Estas variaciones del 5 % no se consideran significativas máxime si se tiene en cuenta que los valores de desviación estándar oscilan entre 2,4 y 8,7 %.

Tabla 5.10. Proporción relativa de *Arquea* y *Bacteria* en biomasa disgregada

Lodo granular	% <i>Arquea</i>	% <i>Bacteria</i>
Inicial	59,5±2,4	40,5±2,4
RE 365 días	53,8±3,4	46,2±3,4
RC 365 días	60,1±8,7	39,9±8,7
RP365 días	56,7±3,3	43,3±3,3
Planta piloto (carbohidratos) 363 días	28,0±3,4	72,0±3,4

Se analizaron 10 imágenes para cada lodo granular

Para efectos comparativos se colocan en esta tabla los resultados para la biomasa de la planta piloto al finalizar la experimentación con el sustrato tipo carbohidratos. En dicha biomasa el dominio Bacteria presenta la mayor proporción relativa con un valor de 72±3,4 %, diferente al encontrado en el reactor de laboratorio RC alimentado con el mismo sustrato que presentó un valor de 39,9±8,7 %. Esta diferencia es apreciable y puede explicarse a partir de a la configuración de ambos reactores.

El reactor de planta piloto es un híbrido compuesto por un UASB en la parte inferior y un filtro en la parte superior. Esta configuración facilita la retención de biomasa floculenta y de biomasa granular fina en el filtro. La influencia de esta configuración incide también en la distribución por tamaño de la biomasa tal como se discutió anteriormente.

La retención de biomasa floculenta y biomasa granular fina dentro del reactor de planta piloto, implica una mayor retención de bacterias acidogénicas que se asocian a este tipo de biomasa de menor tamaño (Guiot *et al.*, 1992). En el reactor RC de tipo UASB, la biomasa floculenta fue lavada no afectando por lo tanto la proporción relativa de Arquea y Bacteria.

5.3.2. Evolución de la biomasa en planta piloto

Se realizaron estudios de la evolución de una biomasa granular aclimatada a sustrato tipo etanol al cambiar a un agua residual compuesta por dextrina (hidrato de carbono) en planta piloto. La experimentación tuvo una duración de 363 días, cubriendo el arranque con cambio de sustrato y la operación en continuo con diferentes velocidades de carga orgánica (VCO).

Operación de la planta piloto

En la Tabla 5.11 se presentan las diferentes etapas de operación del reactor indicando las VCO utilizadas. El arranque por el cambio de sustrato (etanol a dextrina) se realizó durante 60 días a través de seis alimentaciones discontinuas, seguidas cada una de ellas por un período de suspensión de alimentación y recirculación del efluente. Se procedió de esta manera debido a que se presentaron fallos en el sensor de nivel instalado en la cabeza del reactor USBF (descrito en el apartado 2.3.2 del capítulo 2) por presencia de espuma.

Tabla 5.11. Operación de la planta piloto con agua residual tipo carbohidratos

Fase	Tiempo (d)	VCO (kg DQO·m ⁻³ ·d ⁻¹)
Arranque	0-60	Alimentación discontinua
Fase 1	60-78	2
	78-90	Solo recirculación
Fase 2	90-96	2
	96-113	Solo Recirculación
Fase 3	113-130	5
Fase 4	130-172	7,5
Fase 5	172-215	3,5
Fase 6	215-363	VCO variables

El sensor de nivel controla la válvula que permite la salida del efluente, al ser *engañado* dicho sensor por la presencia de espuma, ordena a la válvula mantener la posición de apertura con lo cual el nivel de líquido en la cabeza del reactor desciende por debajo del nivel de succión de la bomba de recirculación, al quedarse

en vacío la bomba de recirculación falla, por consiguiente, el sistema de calentamiento del reactor también falla. Este comportamiento se presentó durante el arranque y las fases 1 y 2 de operación del reactor.

Después del arranque se realizó la operación del reactor en continuo en seis fases de operación. En las cinco primeras se mantuvo el tiempo de retención hidráulico en 24 h aplicando un caudal de entrada de $48,3 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. En la sexta fase se realizaron experimentos de validación de diferentes controladores, por lo que el caudal de entrada fue variable.

Perfiles de lodo y composición química de la biomasa

Con el fin de evaluar los cambios en la cantidad y distribución de la biomasa presente en el reactor se realizaron perfiles de lodo al inicio y a los 78, 138, 176, 210 y 365 días de operación con el agua residual tipo carbohidratos. En la Figura 5.18 se presentan los diferentes perfiles indicando la relación concentración de SSV ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) con la altura del lecho de lodo. En la Tabla 5.12 se muestra la evolución de la cantidad total de biomasa en el reactor.

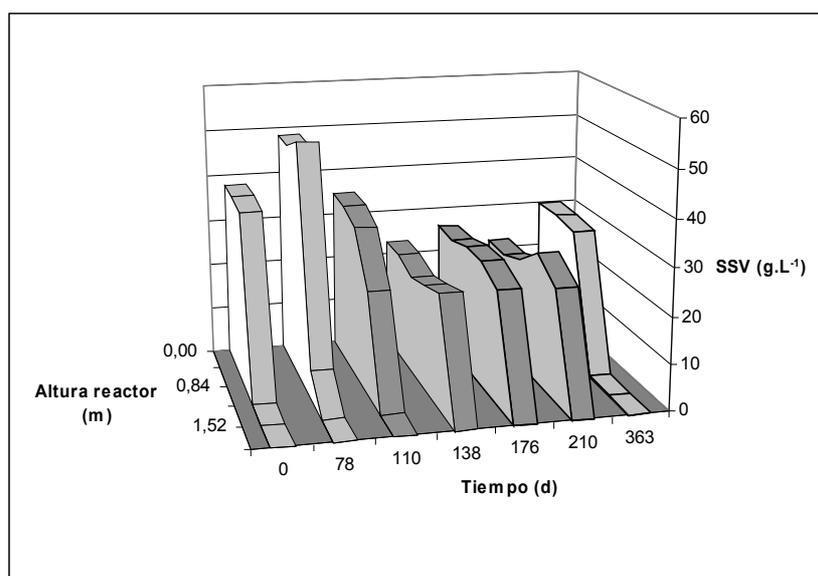


Figura 5.18. Perfiles de lodo durante el período de operación con agua residual tipo carbohidratos.

Al inicio del experimento (tiempo cero) el manto de lodos se localiza entre el fondo del reactor y el puerto ubicado a 0,84 m de altura desde el fondo del reactor, presentando la típica estructura del perfil de lodo en un reactor UASB. La cantidad total de biomasa es 15,5 kg de SSV.

Cumplidos 78 días de operación se observa un aumento importante en la cantidad total de biomasa (21,5 kg de SSV). Adicionalmente se detecta presencia de biomasa en el puerto de muestreo localizado a 1,20 m de altura desde el fondo del reactor con una concentración de 6,2 g SSV•L⁻¹; lo cual indica el inicio de la expansión del lecho.

El aumento en la cantidad total de biomasa puede explicarse a partir del cambio de sustrato; al utilizarse un sustrato no acidificado como la dextrina se requiere del desarrollo de una nueva población de microorganismos encargados de acidificar los hidratos de carbono presentes en el sustrato.

Tabla 5.12. Evolución de la cantidad total y fracción orgánica de la biomasa

Tiempo (días)	Biomasa Total (kg SSV)	SSV/SST
0	15,5	0,85
78	21,5	0,88
110	17,7	0,85
138	16,7	0,84
176	19,5	0,83
210	17,6	0,88
363	12,1	0,88

A los 110 días de operación se presenta claramente la expansión del lecho de lodo, la concentración de SSV disminuye en el fondo del reactor (pasando de 48,4 a 34,6 g SSV•L⁻¹) y aparece una mayor concentración de biomasa (22,3 g SSV•L⁻¹) en el puerto ubicado a 1,20 m de altura desde el fondo del reactor. Paralelamente se detecta la presencia de biomasa floculenta y la salida de biomasa en el efluente. La biomasa total toma el valor de 17,7 kg de SSV, disminuyendo su valor como consecuencia del lavado de biomasa.

Los perfiles de lodo evaluados en los 138, 176 y 210 días de operación son muy similares, se expande el lecho en toda la sección UASB del reactor y se detecta biomasa en todos los puertos de muestreo, incluyendo el puerto localizado a 1,52 m de altura con respecto al fondo del reactor. La cantidad total de biomasa en estas tres evaluaciones es similar y oscila entre 17 y 19 kg de SSV.

Por último, cumplidos 363 días de experimentación se detecta la ruptura de los gránulos y el regreso a un perfil de lodos muy similar al inicial con la biomasa acumulada en la zona inferior del reactor. Paralelamente a la des-granulación tiene lugar el lavado de la biomasa, lo que implica una reducción importante en la cantidad total de biomasa en el reactor, que alcanza un valor de 12, 1 kg de SSV. La relación SSV/SST presenta un valor muy homogéneo a lo largo de la experimentación oscilando entre 0,83 y 0,88. Estos valores son similares a los

Evolución de la ecología microbiana y características técnicas de gránulos anaerobios sometidos a diferentes aguas residuales

encontrados en la biomasa del reactor de laboratorio alimentado con el mismo sustrato (dextrina), que presenta valores entre 0,87 y 0,90.

La Tabla 5.13 presenta la evolución de la composición elemental de la biomasa. La relación C/N en los días 176 y 363 muestra valores similares a los presentados en la biomasa del reactor RC. El valor más alto en la relación C/N puede estar relacionado con un contenido mayor de carbono o menor de nitrógeno. Tal como se expresó en el apartado anterior este hecho estaría relacionado con la presencia de una mayor cantidad de polímeros extracelulares excretados por la biomasa acidogénica desarrollada al cambiar al sustrato no acidificado (carbohidratos).

Tabla 5.13. Evolución de la composición elemental

Elemento	Tiempo en días		
	0	176	363
Nitrógeno (%)	9,4	8,2	8,2
Carbono (%)	46,8	43,4	44,6
Hidrógeno (%)	6,9	6,5	6,8
Relación C/N	5,0	5,3	5,4

Características de sedimentación

En la Tabla 5.14 se muestran los resultados de la velocidad de sedimentación y el índice volumétrico de lodos, para la biomasa inoculada y para la biomasa muestreada en los días 176 y 363 de la operación. En el día 176, cuando el lecho está totalmente expandido, la velocidad de sedimentación de la biomasa granular presenta un aumento considerable ($39,5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) con respecto a la velocidad de sedimentación de la biomasa inicial ($26,5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$), esta variación esta relacionada con el aumento en el diámetro promedio de los gránulos. Sin embargo la presencia de biomasa floculenta con velocidad de sedimentación de $5,1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ deteriora la sedimentación del conjunto.

Tabla 5.14. Cambios en la velocidad de sedimentación (V_s) e índice volumétrico de lodos (IVL)

Tiempo (días)	Vs Biomasa granular	Vs Biomasa floculenta	IVL ($\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$)
	($\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$)	($\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$)	
0	26,5		22,8
176	39,5	5,1	36,5
363	6,1		28,7

El IVL muestra para el día 176 un valor de $36,5 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$, acusando el efecto de hinchamiento de la biomasa por la presencia de lodo floculento; este valor es similar al presentado por la biomasa del reactor de laboratorio RC ($43,5 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$).

Capítulo 5

Al finalizar el experimento (363 días), la biomasa sufre un proceso de desgranulación, presentando una velocidad de sedimentación similar a la del lodo floculento. Sin embargo el valor del IVL es menor ($28,7 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$), lo que indica que la biomasa es más compacta. El hecho posiblemente esté relacionado con el lavado de una fracción importante de la biomasa floculenta durante el proceso de desgranulación.

Morfología y distribución por tamaño

Se realizaron análisis de la distribución por tamaño para la biomasa muestreada en los distintos puertos a los 78, 138, 176 y 363 días de operación con el sustrato dextrina. La Tabla 5.15 presenta la evolución del diámetro promedio, según el puerto de toma de muestra. El diámetro promedio aumenta considerablemente hasta el día 176 en los puertos de muestreo 1 y 2; posteriormente al desgranular la biomasa, el diámetro promedio disminuye drásticamente de acuerdo con la distribución encontrada en el día 363.

La des-granulación ocurrió tras el aumento del tamaño de los gránulos de un diámetro promedio de alrededor de 1,8 mm a valores del orden de 2,5 a 3 mm. La nueva biomasa generada por el cambio de sustrato colonizó los gránulos existentes, que aumentaron gradualmente de tamaño. Posteriormente tuvo lugar la ruptura de los gránulos debido posiblemente a una combinación de limitaciones en la transferencia de masa (Gonzalez-Gil *et al.*, 2001a), causando la muerte de la biomasa en la zona interna del gránulo y la pérdida de soporte debido a estrés mecánico. Este comportamiento concuerda con el mecanismo de equilibrio dinámico propuesto por Grotenhuis *et al.* (1991b).

Tabla 5.15. Variación en el tiempo del diámetro promedio (mm) para cada puerto de muestreo.

Tiempo (d)	P1 (*0,5 m)	P2 (*0,84 m)	P3 (*1,20 m)	P4 (*1,52 m)
0	1,48 ± 1,05	1,97 ± 1,25		
78	1,99 ± 0,92	1,94 ± 1,03		
138	2,28 ± 0,79	2,42 ± 0,64	2,70 ± 0,69	2,67 ± 0,77
176	2,62 ± 0,75	2,64 ± 0,81	2,86 ± 0,69	2,86 ± 0,68
210	2,62 ± 0,83	2,39 ± 0,95	3,16 ± 0,92	2,97 ± 0,94
363	0,89 ± 0,33	0,89 ± 0,30		

* Altura con respecto al fondo del reactor

Elias *et al.* (1999) encontraron una variación similar en el tamaño de los gránulos en un reactor UASB utilizando glucosa como sustrato; los gránulos aumentaron de diámetro de un rango inicial de 0,45-0,92 mm a un rango final de 0,96-3,97 al cabo de 300 días de experimentación. La biomasa final presentó como características relevantes la baja velocidad de sedimentación y la tendencia a atrapar biogás, lo cual generó expansión del lecho y pérdida de biomasa.

La Figura 5.19 muestra la variación del diámetro promedio a diversas la alturas del lecho de lodo para el día 138, se debe recordar que desde el día 110 se detectó la expansión del lecho. En dicha figura se puede observar que los mayores tamaños promedio se encuentran en la parte superior del reactor, lo cual indica que los gránulos de mayor diámetro presentaban menor densidad, debido posiblemente a la presencia de biogás atrapado dentro del gránulo. En los días 176 y 210 se presenta también una configuración similar siendo el diámetro promedio de los gránulos localizados en la parte superior del reactor mayor que el diámetro de los gránulos ubicados en el fondo del reactor.

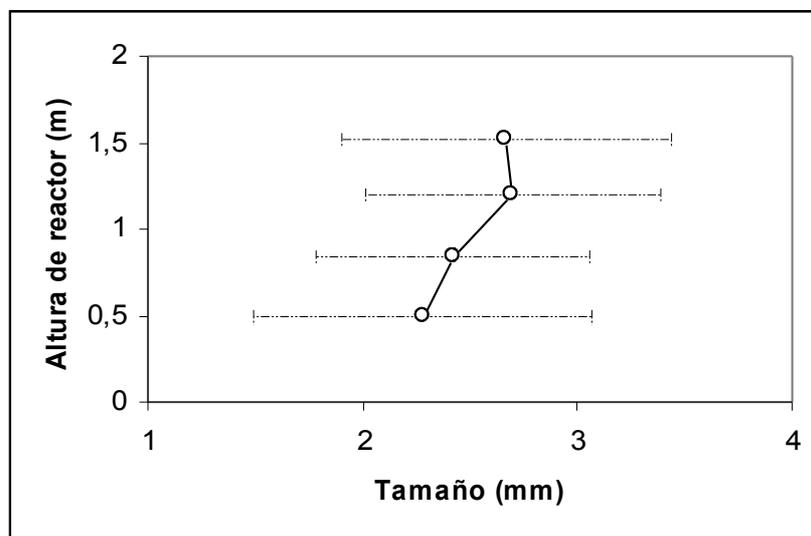


Figura 5.19. Variación del diámetro promedio con la altura a los 138 días de operación.

Saiki *et al.* (2002) obtuvieron, para biomasa granular, una relación directa entre el espesor de la capa externa compuesta fundamentalmente por microorganismos del dominio *Bacteria* con la flotación de los gránulos. Estos investigadores encontraron que un incremento en el espesor de esta capa por encima de 50 μm incrementa la flotación de gránulos, posiblemente debido a presencia de biogás atrapado dentro del gránulo.

En la Figura 5.20 se muestra la evolución de la distribución por tamaño de la biomasa en el puerto 1, en el inicio, a los 210 días de operación y la final. Teniendo en cuenta el importante incremento del diámetro de los gránulos debido a la colonización por bacterias acidogénicas, es factible que los gránulos de mayor diámetro atrapen biogás y floten ubicándose en la parte superior del lecho de lodo

(Saiki *et al.*, 2002). Elias *et al.* (1999) detectaron un fenómeno similar en gránulos sometidos a un sustrato no acidificado.

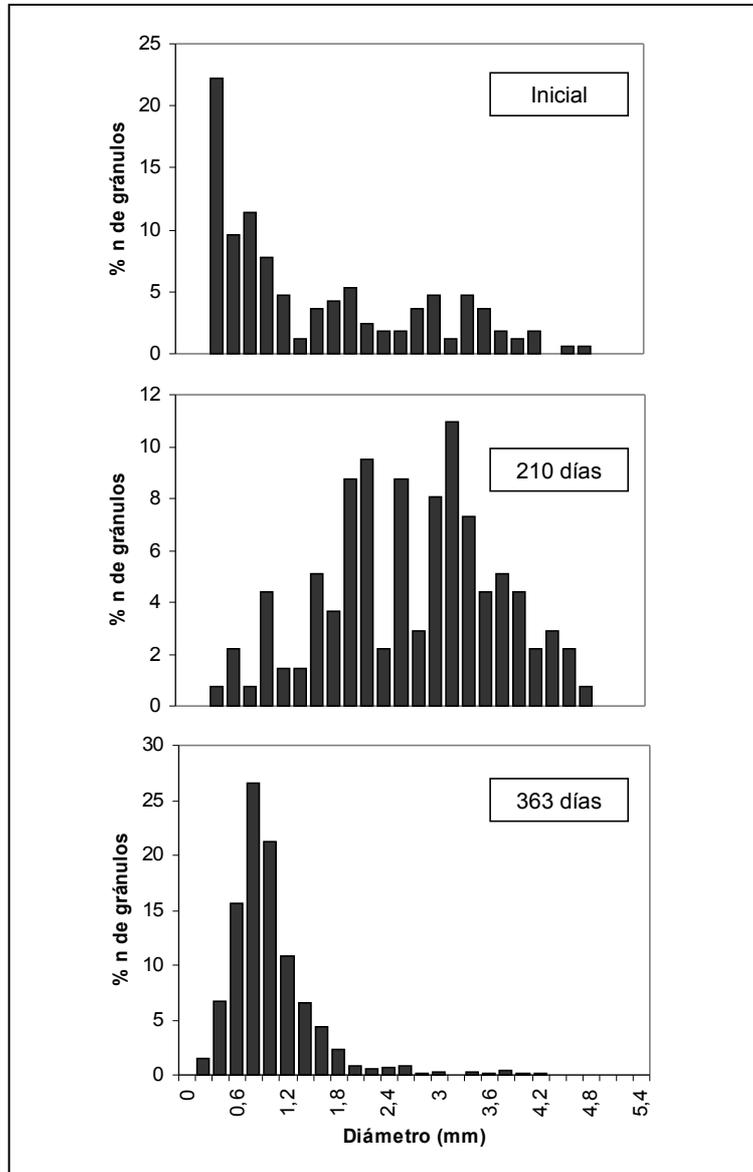


Figura 5.20. Evolución de la distribución por tamaño para el puerto de muestreo 1.

Según la Figura 5.20, la biomasa inicial presenta una distribución asimétrica de tamaños, teniendo el 22% de gránulos diámetros menores de 0,4 mm. El diámetro promedio es de 1,48 mm y la distribución presenta un sesgo a la derecha que indica

que la mayoría de los gránulos tienen diámetros pequeños (50% de los gránulos con diámetro menor a 1 mm).

La distribución por tamaño a los 210 días de experimentación presenta un aspecto totalmente diferente al inicial, con menos del 1 % de los gránulos con diámetros menores de 0,4 mm. El perfil de la distribución es simétrico, con un diámetro promedio de 2,6 mm y un 92 % de los gránulos tienen diámetros mayores de 1 mm. Estos resultados confirman el aumento de tamaño de los gránulos debido a la colonización con nueva biomasa al cambiar de sustrato.

Finalizado el experimento (363 días), como resultado de la desgranulación, la distribución presenta una estructura simétrica con un diámetro promedio de 0,89 mm y solo el 8 % de gránulos tienen diámetro menor que 0,4 mm.

La Figura 5.21 presenta los cambios en el aspecto exterior de los gránulos durante el período de experimentación. En dicha figura puede observarse la colonización de los gránulos originales por parte de la nueva biomasa; en la fotografía correspondiente a los 138 días de experimentación, es posible observar la superficie del gránulo original y la nueva capa de biomasa con espesor aproximado de 0,1 a 0,2 mm.

Al cumplirse 210 días de experimentación se observa que los gránulos están totalmente recubiertos por la nueva biomasa, el color de los gránulos es más claro y la capa exterior de biomasa tiene un aspecto más esponjoso. Al observar la fotografía de la biomasa para el día 363 de experimentación se identifican tanto gránulos redondeados, de color oscuro y con tamaño similar a los gránulos originales, como partes de color negro y forma irregular que aparentemente formaron parte del núcleo (gránulo original). Paralelamente se observan gránulos más pequeños, de forma menos redondeada y de color claro y que posiblemente formaron parte de la capa externa del gránulo colonizado.

De acuerdo con el mecanismo propuesto por Grotenhuis *et al.* (1991b), la ruptura de los gránulos se presentó debido a la acción combinada de falta de sustrato por una resistencia importante a la transferencia de materia y estrés mecánico. Es posible que la ruptura del gránulo se presente de dos maneras. En la primera afectando solo las capas exteriores y por lo tanto liberando el núcleo (gránulo original) más o menos intacto y en la segunda afectando a todo el gránulo.

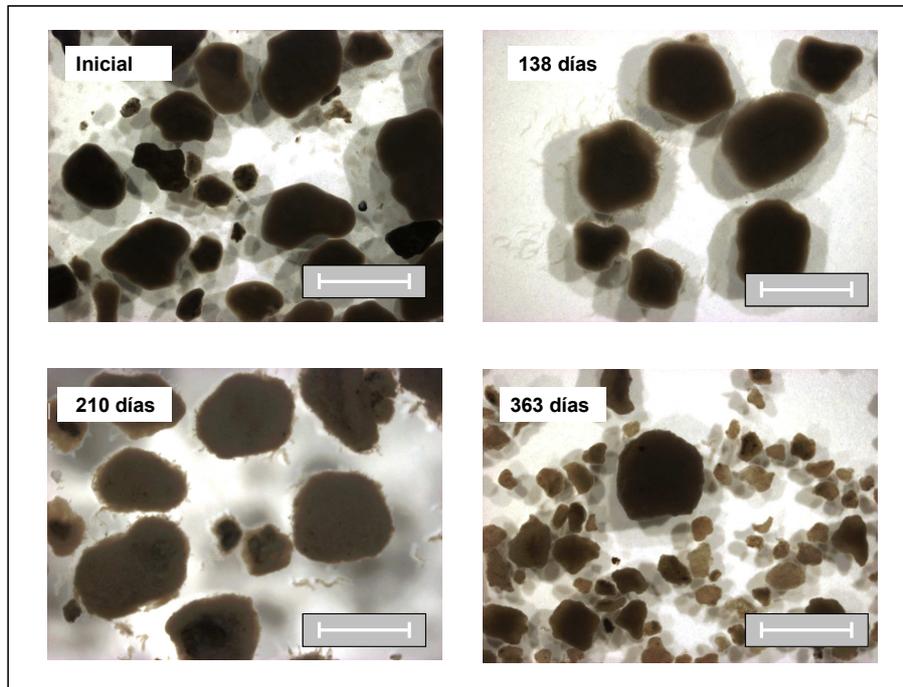


Figura 5.21. Cambios en el aspecto de los gránulos durante el período de experimentación; la barra corresponde a una longitud de 2 mm.

Actividad acidogénica específica (AAE)

En la Figura 5.22 se presenta la evolución de la actividad acidogénica específica (AAE) durante la experimentación. Se puede observar la tendencia al aumento sostenido en la AAE en la medida en que la biomasa original fue colonizada por las bacterias acidogénicas. La dinámica de aumento en la AAE y los valores alcanzados al finalizar la experimentación son similares a los observados en el reactor de laboratorio RC. En ambos casos se presenta un aumento sostenido de la AAE y su valor final en ambos casos para el sustrato dextrina, se sitúa entre 25 y 30 g DQO·g SSV⁻¹·d⁻¹.

Con el fin de disponer de más información para poder dilucidar el tipo de biomasa presente en el lodo floculento, se realizó el ensayo de AAE con una muestra de este lodo tomada el día 138; resultando un valor de 28 ± 6 g DQO·g SSV·d⁻¹ similar al presentado por el conjunto de la biomasa al finalizar el experimento. Este resultado posiblemente esté relacionado con el alto contenido de bacterias acidogénicas presente en la biomasa floculenta.

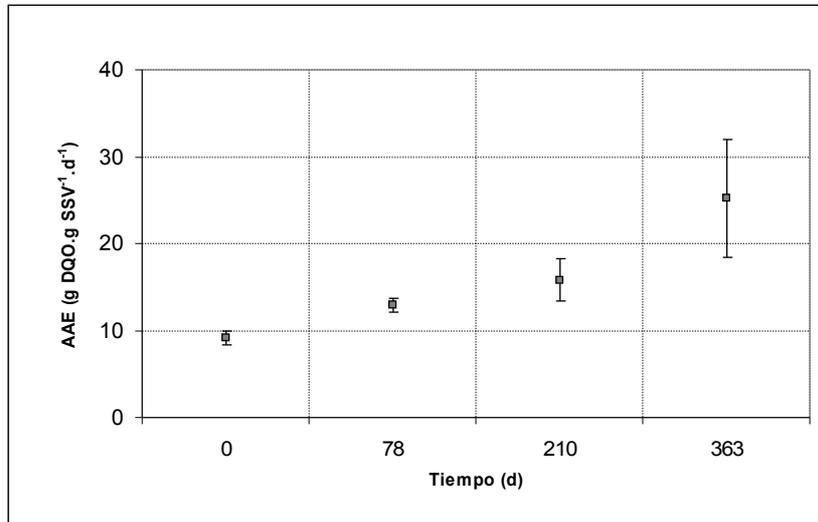


Figura 5.22. Evolución de la actividad acidogénica específica (AAE).

Actividad metanogénica específica (AME)

La Tabla 5.16 presenta la evolución de la actividad metanogénica específica y la Figura 5.23 ilustra dicha evolución para el valor promedio. En la tabla 5.16 se incluye la AME para la biomasa floculenta presente en el reactor el día 138. Inicialmente las actividades con los sustratos acetato y etanol disminuyen, tomando valores entre 0,4 a 0,5 g DQO-CH₄:g SSV⁻¹·d⁻¹ durante la fase intermedia de experimentación (100 a 250 días); por otro lado la AME para el sustrato H₂/CO₂ mantiene valores altos, entre 0,9 y 1,5 g DQO-CH₄:g SSV⁻¹·d⁻¹ durante todo el período de experimentación.

La disminución de la AME con los sustratos acetato y etanol coincide con la colonización de los gránulos por la nueva biomasa debido al cambio de sustrato. Paralelamente la AME con el sustrato H₂/CO₂ mantiene valores altos y la actividad acidogénica específica aumenta considerablemente (pasando de 18 a 32 g DQO·g SSV·d⁻¹). Estos resultados indican que la nueva biomasa tiene una presencia importante de bacterias acidogénicas y microorganismos metanogénicos hidrogenófilos. Lo anterior se confirma con las actividades evaluadas en la biomasa floculenta para el día 138 de operación, presentando un valor alto para la AAE (28 g DQO·g SSV·d⁻¹), acompañada de una AME no detectable con el sustrato acetato, pero relativamente alta con los sustratos etanol y H₂/CO₂.

Al analizar dicha biomasa floculenta y la biomasa inicial, utilizando la técnica FISH (realizando la cuantificación relativa según la metodología explicada en el apartado 5.2.3), se encontró una proporción relativa del 90,0±3,5 % para

Capítulo 5

Methanobacterium y 10,0±3,5 % para *Methanosaeta*; mientras que el lodo original (antes del cambio de sustrato de etanol a hidratos de carbono) presentaba una proporción del 45,9±12,5 % y 54,1±12,5 % para *Methanobacterium* y *Methanosaeta* respectivamente. Lo cual explica el valor alto de la AME con el sustrato H₂/CO₂. Estos resultados, en consonancia con los publicados por Guiot *et al.* (1992), indican que la biomasa floculenta está asociada a bacterias acidogénicas y microorganismos metanogénicos hidrogenófilos.

Tabla 5.16. Evolución de la actividad metanogénica específica

Sustratos	Tiempo (días)				
	Inicial	78	138	210	363
Acetato	0,85±0,02	0,44±0,07	0,47±0,05 N.D.*	0,43±0,04	0,56±0,07
Etanol	0,97±0,11	0,69±0,04	0,46±0,03 0,44±0,03*	0,43±0,02	0,85±0,05
H ₂ /CO ₂	1,07±0,11	1,46±0,20	0,90±0,12 1,59±0,02*	1,31±0,32	1,42±0,33

*Biomasa floculenta, N.D. no detectada

La evolución de las actividades acidogénica y metanogénica correspondientes a la biomasa de la planta piloto es bastante similar a la observada en el laboratorio con el reactor RC, que presentó paralelamente un aumento tanto de la AME con el sustrato H₂/CO₂ como de la AAE.

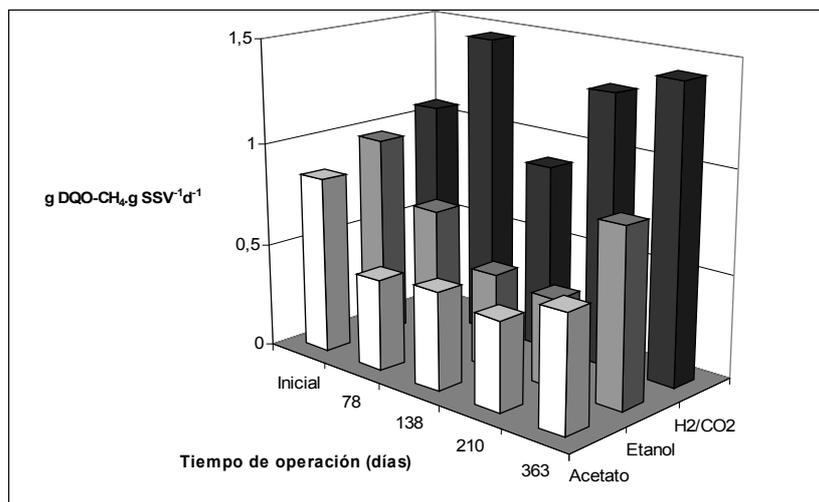


Figura 5.23. Evolución de la actividad metanogénica específica (AME).

5.4. Conclusiones

En este capítulo se estudió el efecto de diferentes sustratos sobre las propiedades de lodo granular aclimatado a etanol (vino diluido). Se realizaron experimentos en reactores UASB de laboratorio y en un reactor piloto híbrido compuesto por un UASB en la parte inferior y un filtro anaerobio en la parte superior. La configuración de los reactores utilizados influyó directamente en las características finales de la biomasa. En el reactor piloto híbrido, al cambiar de un sustrato simple (etanol) a un sustrato no acidificado (dextrina), se retiene la biomasa floculenta, teniendo lugar una expansión del lecho de lodo, el lavado de biomasa y el posterior deterioro de la biomasa granular al presentarse ruptura parcial de los gránulos. En los reactores UASB, por el contrario la biomasa floculenta fue lavada y permaneció el lodo de tipo granular.

La composición microbiológica de la biomasa evidencia la influencia de la configuración del reactor en el tipo de biomasa resultante. En planta piloto para el sustrato tipo carbohidratos, el dominio Bacteria presenta el porcentaje mayor, indicando la acumulación de biomasa acidogénica de tipo floculento. Sin embargo en el reactor UASB de laboratorio, utilizando el mismo sustrato, las poblaciones de los dominios Bacteria y Arquea se encuentran en proporciones similares.

Las características hidrodinámicas de la biomasa granular están directamente relacionadas con la distribución por tamaño y la densidad de los gránulos. Se observaron mayores densidades en los gránulos con mayor contenido en minerales. Los minerales más abundantes en los gránulos son: calcio, fósforo, azufre, potasio y hierro.

Para el sustrato tipo carbohidratos (dextrina) tanto en los reactores de laboratorio como en planta piloto, la composición de los gránulos presentó una relación carbono/nitrógeno mayor que con los otros dos sustratos (etanol y proteína), que puede deberse a una mayor presencia de polímeros extracelulares en la biomasa aclimatada a carbohidratos.

Al someter la biomasa granular aclimatada a un sustrato simple (etanol) a sustratos complejos o no acidificados (dextrina y proteína), los gránulos originales fueron colonizados en forma de capas por nueva biomasa, compuesta por bacterias acidogénicas y microorganismos metanogénicos. Dicha colonización generó un aumento importante en el tamaño de los gránulos y aumentos considerables en la actividad acidogénica específica y en la actividad metanogénica hidrogenófila.

La expansión del lecho de lodo observada en planta piloto para el sustrato tipo carbohidratos, puede relacionarse también con la flotación de los gránulos causada por limitaciones en la transferencia del biogás al exterior del gránulo, esto se confirma al encontrar en el lecho expandido los gránulos de mayor diámetro en la zona superior del lecho.

La presencia de biomasa floculenta esta relacionada con presencia de bacterias acidogénicas y microorganismos metanogénicos hidrogenófilos, lo que se comprobó al evaluar las actividades de la biomasa floculenta; presentando dicha biomasa actividad acidogénica específica alta, actividad metanogénica hidrogenófila media y actividad metanogénica acetoclasta nula.

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que el proceso de colonización de gránulos previamente formados, depende del tipo de sustrato utilizado, de las condiciones hidrodinámicas del reactor y de la configuración del reactor. Se comprobó que utilizando un sustrato tipo carbohidratos se presentan problemas de expansión del lecho de lodo, generación de biomasa floculenta, pérdida de biomasa y disminución en la actividad metanogénica acetoclásta de dicha biomasa.

5.5. Referencias

- Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereu, R. and Stahl D.A. (1990). Combination of 16S Ribosomal-rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial-Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1919-1925.
- Angenent L.T., Sung S. and Raskin L.(2004). Formation of granules and *Methanosaeta* fibres in anaerobic migrating blanket reactor (AMBR). *Environmental Microbiology*, 6(4), 315-322.
- Anthonisen A.C, Loehr R.C, Prakasam T.B.S., Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of the Water Pollution Control Federation* ,48 (5), 835-852.
- Baloch M.I., Akunna J.C., Collier P.J. (2007). The performance of a phase separated granular bed bioreactor treating brewery wastewater. *Bioresource Technology*, 9(9), 1849-1855.
- Batstone D.J. and Keller J. (2001). Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type. *Water Research*, 35(7), 1723-1729.
- Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S.V., Pavlostathis S.G., Rozzi A., Sanders W.T.M., Siegrist H. and Vavilin V.A (2002). *Anaerobic Digestion Model No. 1*. IWA Scientific and Technical Report No. 13. IWA Publishing, London.
- Batstone D.J., Keller J. and Blackall L.L. (2004). The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water Research*, 38(6), 1390-1404.
- Crocetti G., Murto M. and Björnsson L. (2006). An update of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Journal of Microbiological Methods* 65(1), 194-201.
- Díaz-Baez M., Espitia S., Molina F. (2002). *Digestión anaerobia, una aproximación a la tecnología*. Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos, Bogotá.
- Díaz E., Amils R., and Sanz J.L. (2003). Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *Water Science and Technology*, 48(6), 57-64.
- Dolfing J. (1986). Granulation in UASB reactors. *Water Science and Technology*, 18(12), 15-25.
- Elias A., Barona A., Ormazabal J., Ibarra G. and Caamano J. (1999). Anaerobic treatment of acidified and non-acidified substrata in UASB reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(10), 949-956.
- Fang H.H.P., Chui H.K. and Li Y.Y. (1994a). Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters. *Water Science and Technology*, 30(12), 87-96.

- Fang H.H.P., Chui H.K., Li Y.Y. and Chen T. (1994b). Performance and granules characteristics of UASB process treating wastewaters with hydrolyzed proteins. *Water Science and Technology*, 30(8), 55-63.
- Fang H.H.P., Chui H.K. and Li Y.Y. (1995a). Microstructural analysis of UASB granules treating brewery wastewater. *Water Science and Technology*, 31(9), 129-135.
- Fang H.H.P., Chui H.K. and Li Y.Y. (1995b). Effect of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules. *Water Science and Technology*, 32(8), 165-172.
- Fang H.H.P. (2000). Microbial distribution in UASB granules its resulting effects. *Water Science and Technology*, 42(12), 201-208.
- Franco A., Roca E. and Lema J.M. (2006). Granulation in high-load denitrifying upflow sludge bed (USB) pulsed reactors. *Water Research*, 40(5), 871-880.
- Gonzalez-Gil G., Seghezze L., Lettinga G. and Kleerebezem R. (2001a). Kinetics and mass-transfer phenomena in anaerobic granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(2), 125-134.
- Gonzalez-Gil G., Lens P.N.L., van Aelst A., van As H., Versprille A.I. and Lettinga G. (2001b). Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3683-3692.
- Grotenhuis J.T.C., Smit M., Plugge C.M., Yuansheng X., van Lammeren A.A.M., Stams A.J.M. and Zehnder A.J.B. (1991a). Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7), 1942-1949.
- Grotenhuis J.T.C., Kiessel J.C., Plugge C.M., Stams A.J.M. and Zehnder A.J.B. (1991b). Role of substrate concentration in particle size distribution of methanogenic granular sludge in UASB reactors. *Water Research*, 25(1), 21-27.
- Grotenhuis J.T.C., Smit M., van Lammeren A.A.M., Stams A.J.M. and Zehnder A.J.B. (1991c). Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge. *Applied Microbiology and Technology*, 36(1), 115-119.
- Guiot S.R., Pauss A. and Costerton J.W. (1992). A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water Science and Technology*, 25(7), 1-10.
- Hulshoff Pol L.W., de Castro Lopes S.I., Lettinga G. and Lens P.N.L. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, 38(6), 1376-1389.
- Jawed M. and Tare V. (1999). Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA*, 25(3), 345-350.
- Jeison D. and Chamy R. (1998). Novel technique for measuring the size distribution of granules from anaerobic reactors for wastewater treatment. *Biotechnology Techniques*, 12(9), 659-662.

- Jeison D. and Chamy R. (1999). Comparison of the behaviour of expanded granular sludge bed (EGSB) and upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors in dilute and concentrated wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 40 (8), 91-97.
- Karakashev D., Batstone D.J. and Angelidaki I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic composition in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 331-338.
- Lanthier M., Tartakovsky B., Villemur R., DeLuca G. and Guiot S.R. (2002). Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 4035-4043.
- Lettinga G., van Velsen A. F. M., Horma S. W., de Zeeuw W. and Klapwijk A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. 22(4): 699-734.
- MacLeod F.A., Guiot S.R. and Costerton J.W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1598-1607.
- Pereboom J.H.F. (1997). Strength characterisation of microbial granules. *Water Science and Technology*, 36(6-7), 141-148.
- Pereboom J.H.F. (1994). Size distribution model for methanogenic granules from full scale UASB and IC reactors. *Water Science and Technology*, 30(12), 211-221.
- Pereboom J.H.F. and Vereijken T.L.F.M. (1994). Methanogenic granule development in full scale internal circulation reactors. *Water Science and Technology*, 30(8), 9-21.
- Ramsay I.R. and Pullammanappallil P.C. (2001). Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, 12(4), 247-257.
- Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B. R. and Stahl D.A. (1994). Group-specific 16SrRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(4), 1232-1240.
- Saiki Y., Iwabuchi C., Katami A. and Kitagawa Y. (2002). Microbial analyses by Fluorescence *in situ* Hybridization of well-settled sludge in brewery wastewater treatment plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(6), 601-606.

- Sekiguchi Y., Kamagata Y., Nakamura K., Ohashi A. and Harada H. (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16s rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1280-1288.
- Schmidt J.E. and Ahring B.K. (1994). Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(2-3), 457-462.
- Speece, R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press, Nashville, USA.
- Soto M., Mendez R. and Lema J.M. (1992). Characterization and comparison of biomass from mesophilic and thermophilic fixed bed anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 25(7), 203-212.
- Soto M., Mendez R. and Lema J.M. (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. *Water Research*, 27(8), 1361-1376.
- Stahl D. A. and Amann R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, pp. 205-248.
- Tay J.H. and Yan G.Y. (1996). Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Environment Research*, 68(7), 1140-1150.
- Tay T.L.S., Ivanov V., Kim I.S., Feng L. and Tay J.H. (2001). Quantification of ratios of Bacteria and Archaea in methanogenic microbial community by fluorescence in situ hybridization and fluorescence spectrometry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(6), 583-589.
- Uemura S. and Harada H. (1995). Inorganic composition and microbial characteristics of methanogenic granular sludge grown in a thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(12), 358-364.
- Vanderhaegen B., Ysebaert E., Favere K., Van Wambeke M., Peeters T., Panic V., Vandelingenbergh V. and Verstraete W. (1992). Acidogenesis in relation to in-reactor granule yield. *Water Science and Technology*, 25(7), 21-30.
- Wu W., Hickey R. and Zeikus G. (1991). Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulphate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3438-3449.

Conclusiones generales

El sensor ANASENSE® se validó en Planta Piloto, en operación durante 60 días, utilizando un sistema de filtración tangencial de sólidos mediante el que se controlaron eficazmente los problemas de obstrucción y ensuciamiento. Posteriormente el sensor se validó en ambiente industrial en operación continua también durante 60 días. El equipo presentó algunas debilidades en cuanto a robustez. El punto más importante a tener en cuenta es la necesidad de desarrollar un sistema de eliminación de sólidos y de desgasificación del efluente ya que de esto depende en gran parte la aplicabilidad del sensor

Respecto a las metodologías estudiadas, INRA y Applitek presentaron en general buena precisión y exactitud para la determinación de AGV (0 a 4900 mg·L⁻¹) y bicarbonato (0 a 50 mg·L⁻¹). Por otro lado, las metodologías Biomath 1 y 2 permiten la determinación, aunque con un margen de error muy considerable, de otros compuestos como amonio y ácido láctico, generando resultados cualitativos que permiten estimar tendencias.

El analizador presentó un buen rendimiento en la determinación *on-line* de las relaciones de alcalinidad AI/AT y AI/AP, la relación AI/AP mostró mayor sensibilidad en la detección de sobrecargas orgánicas. De acuerdo con estos resultados el ANASENSE® puede utilizarse en la monitorización *on-line* de las relaciones de alcalinidad con el propósito de realizar control en lazo cerrado del proceso de digestión anaerobia.

Una vez instalada una versión comercial del ANASENSE® en la planta piloto se procedió a través de dos metodologías complementarias (Análisis fenomenológico y análisis estadístico) a realizar la selección de los indicadores que permiten identificar el estado del proceso y la detección de perturbaciones operando con dos sustratos tipo.

Se comprobó la utilidad del análisis de componentes principales (PCA) en la reducción de la dimensión multivariable de un conjunto de datos de monitorización del proceso de digestión anaerobia; logrando retener más del 80% de la variabilidad del proceso con las dos primeras componentes principales. Así como la capacidad del análisis factorial discriminante (FDA) para clasificar adecuadamente los datos pertenecientes a diferentes estados estacionarios.

Utilizando una sola variable para la clasificación de los diferentes estados estacionarios se presentan diferencias relevantes entre los dos sustratos tipo. Para el sustrato tipo hidratos de carbono las variables QCH₄ y QBiogas permiten aciertos por encima del 90 % en la clasificación, superando inclusive las variables que caracterizan la entrada al proceso (TOCe y TICe). Mientras que para el sustrato

Conclusiones generales

proteína la clasificación en los diferentes estados estacionarios es más deficiente cuando se utiliza una sola variable y solo las variables TOCe y TICe logran clasificaciones cercanas al 80%

Utilizando combinaciones de 2 y 3 variables para el sustrato tipo hidratos de carbono y proteína respectivamente, se encontró que las combinaciones que mejor clasifican los diferentes estados estacionarios para ambos sustratos tipo son: AGV – AP - QCH₄ y AGV – AP – Qbiogas.

Se identificó la pendiente normalizada como el parámetro clave en la detección de perturbaciones en la VCO, debido a que dicho parámetro representa la velocidad de respuesta del sistema frente a cambios en las características del residuo o cambios en las condiciones de operación del sistema. Por lo tanto para diagnosis y control del proceso es más conveniente realizar la evaluación del cambio relativo del valor de las variables con el tiempo que utilizar el valor absoluto de la variable.

Se encontró que la concentración de CO en fase gas tiene una utilidad muy reducida en la detección de perturbaciones, utilizando dicha variable solo fue posible detectar perturbaciones tipo pulso en el sustrato tipo hidratos de carbono. Por su parte la concentración de H₂ en fase gas es una variable que permite la detección de perturbaciones en la VCO (tipo pulso y escalón) en ambos sustratos estudiados. Sin embargo se debe tener en cuenta que para el sustrato tipo carbohidratos la concentración de H₂ depende directamente del grado de acidificación del sustrato al ingresar al reactor, este hecho puede generar un diagnóstico errado del estado del proceso.

Para ambos sustratos estudiados las variables: QCH₄, QBiogas y AGV son adecuadas en la detección de perturbaciones en la VCO.

De acuerdo con los resultados de este trabajo y considerando los niveles de complejidad y coste de monitorización se proponen tres niveles de instrumentación:

- instrumentación básica (pH, temperatura y caudales): pHmetros; sensores de temperatura y caudalímetros.
- instrumentación necesaria (QBiogas, AGV y AP): analizador de H₂ en fase gas; caudalímetro y analizador titrimétrico de AGV y AP.
- Instrumentación conveniente (H₂): analizador de hidrógeno en fase gas.

Por último se estudió el efecto de diferentes sustratos sobre las propiedades de lodo granular aclimatado a etanol (vino diluido). Se realizaron experimentos en reactores UASB de laboratorio y en un reactor piloto híbrido compuesto por un UASB en la parte inferior y un filtro anaerobio en la parte superior. La configuración de los reactores utilizados influyó directamente en las características finales de la

Conclusiones generales

biomasa. En el reactor piloto híbrido, al cambiar de un sustrato simple (etanol) a un sustrato no acidificado (dextrina), se retiene la biomasa floculenta, teniendo lugar una expansión del lecho de lodo, el lavado de biomasa y el posterior deterioro de la biomasa granular al presentarse ruptura parcial de los gránulos. En los reactores UASB, por el contrario la biomasa floculenta fue lavada y permaneció el lodo de tipo granular.

Las características hidrodinámicas de la biomasa granular están directamente relacionadas con la distribución por tamaño y la densidad de los gránulos. Se observaron mayores densidades en los gránulos con mayor contenido en minerales. Los minerales más abundantes en los gránulos son: calcio, fósforo, azufre, potasio y hierro.

Para el sustrato tipo carbohidratos (dextrina) tanto en los reactores de laboratorio como en planta piloto, la composición de los gránulos presentó una relación carbono/nitrógeno mayor que con los otros dos sustratos (etanol y proteína), que puede deberse a una mayor presencia de polímeros extracelulares en la biomasa aclimatada a carbohidratos.

Al someter la biomasa granular aclimatada a un sustrato simple (etanol) a sustratos complejos o no acidificados (dextrina y proteína), los gránulos originales fueron colonizados por nueva biomasa, compuesta por bacterias acidogénicas y microorganismos metanogénicos. Dicha colonización generó un aumento importante en el tamaño de los gránulos y aumentos considerables en la actividad acidogénica específica y en la actividad metanogénica hidrogenófila.

Los resultados obtenidos indican que el proceso de colonización de gránulos previamente formados, depende del tipo de sustrato utilizado, de las condiciones hidrodinámicas del reactor y de la configuración del reactor. Se comprobó que utilizando un sustrato tipo carbohidratos se presentan problemas de expansión del lecho de lodo, generación de biomasa floculenta, pérdida de biomasa y disminución en la actividad metanogénica acetoclástica de dicha biomasa.

Conclusións xerais

O sensor ANASENSE® validouse na Planta Piloto, en operación durante 60 días, utilizando un sistema de filtración tanxencial de sólidos mediante o que se controlaron eficazmente os problemas de obstrucción e ensuciamiento. Posteriormente o sensor validouse en ambiente industrial en operación continua tamén durante 60 días. O equipo presentou algunhas debilidades en canto a robustez. O punto máis importante a ter en conta é a necesidade de desenvolver un sistema de eliminación de sólidos e de desgasificación do efluente xa que disto depende en gran parte a aplicabilidade do sensor

Respecto das metodoloxías estudadas, INRA e Applitek presentaron en xeral boa precisión e exactitude para a determinación de AGV (0 a 4900 mg·L⁻¹) e bicarbonato (0 a 50 mg·L⁻¹). Doutra banda, as metodoloxías Biomath 1 e 2 permiten a determinación, aínda que cunha marxe de erro moi considerable, doutros compostos como amonio e ácido láctico, xerando resultados cualitativos que permiten estimar tendencias.

O analizador presentou un bo rendemento na determinación *on-line* das relacións de alcalinidade AI/AT e AI/AP, a relación AI/AP mostrou maior sensibilidade na detección de sobrecargas orgánicas. De acordo con estes resultados o ANASENSE® pode utilizarse na monitorización *on-line* das relacións de alcalinidade co propósito de realizar control en lazo pechado do proceso de dixestión anaerobia.

Comprobouse a utilidade da análise de compoñentes principais (PCA) na redución da dimensión multivariable dun conxunto de datos de monitorización do proceso de dixestión anaerobia; logrando reter máis do 80% da variabilidade do proceso coas dúas primeiras compoñentes principais. Así como a capacidade da análise factorial discriminante (FDA) para clasificar adecuadamente os datos pertencentes a diferentes estados estacionarios.

Utilizando unha soa variable para a clasificación dos diferentes estados estacionarios preséntanse diferenzas relevantes entre os dous substratos tipo. Para o substrato tipo hidratos de carbono as variables QCH₄ e QBiogas permiten acertos por encima do 90 % na clasificación, superando inclusive as variables que caracterizan a entrada ao proceso carbono orgánico total y carbono inorgánico total da entrada (TOCe e TICE). Mentres que para o substrato proteína a clasificación nos diferentes estados estacionarios é máis deficiente cando se utiliza unha soa variable e só as variables TOCe e TICE logran clasificacións próximas ao 80%

Conclusiones xerais

Utilizando combinacións de 2 e 3 variables para o substrato tipo hidratos de carbono e proteína respectivamente, atopouse que as combinacións que mellor clasifican os diferentes estados estacionarios para ambos substratos tipo son: AGV – AP - QCH₄ e AGV – AP – Qbiogas.

Identificouse a pendente normalizada como o parámetro chave na detección de perturbacións na VCO, debido a que dito parámetro representa a velocidade de resposta do sistema fronte a cambios nas características do residuo ou cambios nas condicións de operación do sistema. Polo tanto para diagnose e control do proceso é máis conveniente realizar a avaliación do cambio relativo do valor das variables co tempo que utilizar o valor absoluto da variable.

Atopouse que a concentración de CO en fase gas ten unha utilidade moi reducida na detección de perturbacións, utilizando devandita variable só foi posible detectar perturbacións tipo pulso no substrato tipo hidratos de carbono. Pola súa banda a concentración de H₂ en fase gas é unha variable que permite a detección de perturbacións na VCO (tipo pulso e chanzo) en ambos os substratos estudados. Con todo débese ter en conta que para o substrato tipo carbohidratos a concentración de H₂ depende directamente do grao de acidificación do substrato ao ingresar ao reactor, este feito pode xerar un diagnóstico errado do estado do proceso.

Para ambos substratos as variables: QCH₄, QBiogas e AGV son adecuadas na detección de perturbacións na VCO.

De acordo cos resultados deste traballo e considerando os niveis de complexidade e custo de monitorización propónse tres niveis de instrumentación:

- Instrumentación básica (pH, temperatura e caudais): pHmetros; sensores de temperatura e caudalímetros.
- Instrumentación necesaria (caudal de biogás, ácidos graxos volátiles e alcalinidade parcial): caudalímetro de gas e analizador titrimétrico de ácidos graxos volátiles e alcalinidade parcial.
- Instrumentación conveniente (concentración de hidróxeno): analizador de hidróxeno en fase gas.

Para rematar avalíouse o efecto de diferentes substratos sobre as propiedades de lodo granular aclimatado a etanol (viño diluído). Realizáronse experimentos en reactores UASB de laboratorio e nun reactor piloto híbrido composto por un UASB na parte inferior e un filtro anaerobio na parte superior. A configuración dos reactores utilizados influíu directamente nas características finais da biomasa. No reactor piloto híbrido, ao cambiar dun substrato simple (etanol) a un substrato non acidificado (dextrina), retense a biomasa floculenta, tendo lugar unha expansión do leito de lodo, o lavado de biomasa e a posterior deterioración da biomasa granular

~~Conclusiones xerais~~

ao presentarse ruptura parcial dos gránulos. Nos reactores UASB, pola contra a biomasa floculenta foi lavada e permaneceu o lodo de tipo granular.

As características hidrodinámicas da biomasa granular están directamente relacionadas coa distribución por tamaño e a densidade dos gránulos. Observáronse maiores densidades nos gránulos con maior contido en minerais. Os minerais máis abundantes nos gránulos son: calcio, fósforo, xofre, potasio e ferro.

Para o substrato tipo carbohidratos (dextrina) tanto nos reactores de laboratorio como en planta piloto, a composición dos gránulos presentou unha relación carbono/nitróxeno maior que cos outros dous substratos (etanol e proteína), que pode deberse a unha maior presenza de polímeros extracelulares na biomasa aclimatada a carbohidratos.

Ao someter a biomasa granular aclimatada a un substrato simple (etanol) a substratos complexos ou non acidificados (dextrina e proteína), os gránulos orixinais foron colonizados por nova biomasa, composta por bacterias acidoxénicas e microorganismos metanoxénicos. Dita colonización xerou un aumento importante no tamaño dos gránulos e aumentos considerables na actividade acidoxénica específica e na actividade metanoxénica hidroxenófila.

Os resultados obtidos indican que o proceso de colonización de gránulos previamente formados, depende do tipo de substrato utilizado, das condicións hidrodinámicas do reactor e da configuración do reactor. Comprobouse que utilizando un substrato tipo carbohidratos preséntanse problemas de expansión do leito de lodo, xeración de biomasa floculenta, perda de biomasa e diminución na actividade metanoxénica acetoclásta de devandita biomasa.

General conclusions

In this thesis several tools were developed and validated for monitoring and diagnosis of anaerobic wastewater treatment process. One of the critical aspects in the *on-line* monitoring of the process is the deficit of robust and reliable instruments. As a contribution to solve this situation this work shows a the studies and the validation of a prototype of automatic analyzer of alkalinity and volatile fatty acids, operating with three different methodologies; developed by INRA (France, National Institute of Agronomic Research), AppliTek (Belgium, development and commercialization of *on-line* sensors) and Biomath (Belgium, group of the University of Ghent).

INRA and Applitek methodologies displayed good performance in the determination of VFA (0 to 4900 mg · L⁻¹) and bicarbonate (0 to 50 mg · L⁻¹). On the other hand, through the Biomath methodology approximated results of the concentration of other compounds like ammonium and lactic acid are obtained, which can be used to consider tendencies.

The selection of variables in steady state was made using in the first stage Principal Components Analysis (PCA) in order to reduce the dimension of the data; later, the data in steady state were classified using the technique of linear regression on a movable window. Finally in order to select the minimum set of variables required to characterize process performance a Factorial Discriminate Analysis technique (FDA) was used.

Using only one variable, for the carbohydrates-based wastewater; methane flow and biogas flow achieve the better state classification (over 95% of success). For protein-based wastewater the classification is more deficient. When two or three variables were used for both types of wastewaters, two variable combinations achieve a classification over 95% of success, which are: volatile fatty acids-partial alkalinity-methane flow and volatile fatty acids-partial alkalinity-biogas flow.

The carbon monoxide concentration in gas phase has a reduced utility in the detection of disturbances, only for carbohydrates- based wastewater was possible detected pulse disturbances. The hydrogen concentration in gas phase is a variable that allows the detection of disturbances in both synthetic wastewaters. Nevertheless, for carbohydrates-based wastewater, the hydrogen concentration in gas phase depends of acidification degree of substrate before feed the reactor; this fact can cause errors in the diagnosis of the state of the process.

Finally, It was studied the effect of different substrates on the properties of granular sludge acclimatised to ethanol (diluted wine). Experiments were conducted in laboratory UASB reactors and hybrid pilot plant composed of a UASB at the bottom

General conclusions

and an anaerobic filter at the top. The configuration of the reactors used directly influenced the final characteristics of the biomass.

In the pilot plant, due to the change between a simple substrate (ethanol) to a substrate not acidified (dextrin), was presented a retention of flocculent biomass, taking place an expansion of the sludge bed, washing biomass and the subsequent deterioration of granular biomass submitted partial rupture of the granules. In the UASB reactor, by contrast, the flocculent biomass was washed and kept the granular sludge

The physico-chemical properties of granules largely depend upon the type of substrate on which they are grown. Granules fed with ethanol are much more compact than those developed in protein and carbohydrate-based media. Further, micro-organisms distribution in anaerobic granules also depends on the type of wastewater; granules fed with carbohydrates and proteins presented higher acidogenic bacteria colonization. Members of Methanosaetaceae are the dominant methanogens in all three types of granules, while Methanobacteriales are co-dominant in granules fed with carbohydrates and proteins. These results are also verified by comparing the specific methanogenic activity (SMA) using different substrates.