



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Ingeniería Química

**HIDRÓLISIS Y ACIDIFICACIÓN PSICRÓFILA DE
MOLÉCULAS COMPLEJAS EN SISTEMAS
ANAEROBIOS**

Memoria presentada por:

Paola Poirrier González

Para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Diciembre de 2005

Título

Hidrólisis y acidificación psicrófila de moléculas complejas
en sistemas anaerobios

Serie

Tesis Doctorales. Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos – USC

Diseño de Portada

Isla de Pascua - Chile

Reservados todos los derechos. Está 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.

© Paola Poirrier González, 2006

Departamento de Ingeniería Química
Universidade de Santiago de Compostela

Imprime: Lápices4

Av. da Coruña 4

15706 Santiago de Compostela

A Coruña – España

Depósito Legal:

ISBN:

Impreso en España



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Ingeniería Química

Juan Manuel Lema Rodicio, Catedrático de Ingeniería Química de la
Universidade de Santiago de Compostela,

Informa:

Que la memoria titulada “Hidrólisis y Acidificación Psicrófila de Moléculas Complejas en Sistemas Anaerobios” presentada por Paola Poirrier González para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química, Programa de Doctorado en Ingeniería Química y Ambiental, ha sido realizada bajo mi inmediata dirección en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidade de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firma en Santiago de Compostela, el 21 de septiembre de 2005.

Fdo. Juan M. Lema

Esta memoria fue presentada el 12 de diciembre del 2005 en el Salón de Actos de la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Santiago de Compostela, ante el tribunal constituido por:

- **Dr. Alfons J. M. Stams**, del Laboratory of Microbiology de la Wageningen University, Holanda
- **Dr. Rolando Chamy Maggi**, de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile
- **Dr. Juan Ignacio Tejero Monzón**, del Departamento de Ciencias Técnicas del Agua y del Medio Ambiente de la Universidad de Cantabria, España
- **Dr. Santiago Villaverde Gómez**, del Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid, España
- **Dr. Francisco Omil Prieto**, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela, España

Recibiendo la calificación de *Sobresaliente Cum Laude*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría en primer lugar agradecer al Gobierno de Chile por otorgarme la Beca Presidente de la República, a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso por patrocinarme y a la Universidad de Santiago de Compostela por acogerme, permitiéndome llevar a cabo mis estudios de Doctorado.

En forma destacada quisiera agradecer a mis colegas de la Escuela de Ingeniería Bioquímica por la confianza y respaldo entregado.

A Juan, mi tutor, por estar cuando te necesité. Siempre nos tendiste la mano en el momento adecuado.

A Rolando, más que un colega un amigo ya desde hace años. Al finalizar este paseo por el viejo mundo te agradezco la paciente insistencia que nos llevó a tomar la difícil decisión de coger las maletas y atravesar el Atlántico. Tus esporádicos correos, algunos increíblemente extensos!!, me alegraron las mañanas, tardes y noches en más de una ocasión.

A Belén y Diego, medio españoles, medio gallegos, medio chilenos y ahora medio catalanes. Un bico a la distancia!

A la colonia: Gonzalo-Lorena, Carlos-Maryann, Lorena-Carlos, Rodrigo-Claudia, Vinka-Brandom y muchos más, por acercar nuestra tierra y ayudarnos a seguir siendo Chilenos.

A José Antonio y Azucena, dos nuevos y buenos amigos, idónde nos vinimos a conocer!

A Priscilla, porque a pesar de ser medio gallega aún es medio chilena, representando lo que ha sido nuestra vida en esta hermosa tierra. ¡Nunca había visto un paisaje tan increíblemente verde!

A los compañeros de laboratorio y profesores. Es difícil mencionarlos a todos. ...en primer lugar porque son muchos y en segundo porque sólo tuve el gusto de conocer a unos pocos. Así que para no quedar mal, mejor lo resumo todo en un gigantesco GRACIAS a todos por estar allí. Más, también sería injusto olvidar mencionar la dulzura de Elena, la eterna sonrisa de Marta, la sabiduría de Thelmo, la preocupación por mis hijas de Carmen y Gemma, los "arrebatos" de Amaya, la presencia de Lara (y Mati, por supuesto), las Paulas y Jorge..

En el apoyo logístico, mi agradecimiento a Mar, Magdalena y por supuesto a Rosiña. Un agradecimiento especial a los traductores oficiales de esta Tesis: Elena, Vinka y José Antonio.

A Juanca por convertirse en uno de las personas más queridas y por estar dispuesto a compartir la tarea de investigar implementando proyectos conjuntos. Paco, Dora-Lía, Santiago, Andrés y Juliana, quienes forman parte de la colonia colombiana, amigos y compañeros de cuánto paseo y celebración hubiera. Más que amigos, pasaron a formar parte de nuestra familia, acercando nuestros pueblos.

A las visitas: tíos, hermanos, primos y amigos. Todos ustedes lograron que nos sintiéramos acompañados, aunque estuviéramos al otro lado del mundo.

A mi madre, por acompañarnos año tras año y "repartirse" equitativamente entre sus hijos, viajeros por el mundo. Me alegra haber hecho realidad tu sueño de visitar España, la tierra de tus padres, la tierra de mis abuelos.

A mis hermanos, cada uno en un rincón del planeta, no se si será genético esto de pasear por el mundo, pero si se que a pesar de la distancia siempre hemos estado juntos y espero que así siga ocurriendo.

A mis hermosas hijas, Catalina y Sofia. Esta tierra las ha visto crecer y también las ha visto felices por vivir esta vida que les tocó. Espero que se queden grabados en vuestra memoria los recuerdos de nuestra aventura y que además sepan conservar las grandes amistades que han sabido cultivar.

Y finalmente a Julio; marido, compañero y cómplice ya desde hace casi 11 años.

A todos y cada uno. . . .gracias.

INDICE

RESUMEN

RESUMO

SUMMARY

OBJETIVOS

CAPÍTULO PRIMERO. Antecedentes generales

1.1	MACROMOLÉCULAS EN AGUAS RESIDUALES	1-3
1.2	EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA	1-4
1.2.1	<i>Hidrólisis y acidogénesis de macromoléculas</i>	<i>1-6</i>
1.2.2	<i>Mecanismos asociados al proceso de hidrólisis de sustratos complejos</i>	<i>1-7</i>
1.2.3	<i>Efecto de la temperatura.....</i>	<i>1-10</i>
1.2.4	<i>Efecto del pH</i>	<i>1-11</i>
1.2.5	<i>Efecto de la estructura del sustrato</i>	<i>1-12</i>
1.2.6	<i>Modelación del proceso de hidrólisis en sistemas anaerobios</i>	<i>1-14</i>
1.3	REACTORES DE MEMBRANA	1-15
1.4	REFERENCIAS.....	1-19

CAPÍTULO SEGUNDO. Metodología analítica, materiales y equipos

2.1	CARACTERÍSTICAS DEL AGUA SINTÉTICA.....	2-3
2.2	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	2-4
2.2.1	<i>Actividad hidrolítica</i>	<i>2-4</i>
2.2.2	<i>Actividad acidogénica.....</i>	<i>2-5</i>
2.2.3	<i>Actividad metanogénica.....</i>	<i>2-6</i>
2.2.4	<i>Fraccionamiento molecular.....</i>	<i>2-7</i>
2.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	2-10
2.3.1	<i>Fase líquida</i>	<i>2-10</i>
2.3.2	<i>Fase sólida.....</i>	<i>2-18</i>
2.4	REFERENCIAS.....	2-19

CAPÍTULO TERCERO. Hidrólisis-acidogénesis anaerobia de almidón

3.1	INTRODUCCIÓN	3-3
3.2	OBJETIVOS	3-7
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	3-7
3.3.1	<i>Ensayos en discontinuo</i>	3-7
3.3.2	<i>Ensayos en continuo</i>	3-8
3.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	3-14
3.4.1	<i>Caracterización del inóculo</i>	3-14
3.4.2	<i>Ensayos en discontinuo</i>	3-15
3.4.3	<i>Ensayos en continuo</i>	3-19
3.5	CONCLUSIONES	3-35
3.6	REFERENCIAS	3-36

CAPÍTULO CUARTO. Influencia del contenido de nutrientes en el proceso de hidrólisis-acidogénesis de almidón

4.1	INTRODUCCIÓN	4-3
4.2	OBJETIVOS	4-7
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS	4-7
4.3.1	<i>Ensayos en continuo</i>	4-7
4.3.2	<i>Ensayos en discontinuo</i>	4-8
4.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4-9
4.4.1	<i>Operación en continuo</i>	4-9
4.4.2	<i>Ensayos en discontinuo</i>	4-15
4.4.3	<i>Caracterización de la biomasa</i>	4-17
4.5	CONCLUSIONES	4-18
4.6	REFERENCIAS	4-19

CAPÍTULO QUINTO. Hidrólisis-acidogénesis anaerobia de gelatina

5.1	INTRODUCCIÓN	5-3
5.2	OBJETIVOS	5-6
5.3	MATERIALES Y MÉTODOS	5-6
5.3.1	<i>Ensayos en discontinuo</i>	5-6
5.3.2	<i>Ensayos en continuo</i>	5-7
5.3.3	<i>Determinación de OUR</i>	5-8
5.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5-13

5.4.1	Caracterización del inóculo.....	5-13
5.4.2	Ensayos en continuo	5-16
5.4.3	Caracterización de la biomasa adaptada a la degradación de gelatina.	5-24
5.4.4	Análisis de biodegradabilidad por medio de la medida de OUR.....	5-24
5.5	CONCLUSIONES	5-26
5.6	REFERENCIAS.....	5-27

CAPÍTULO SEXTO. Desarrollo de agregados bacterianos en el proceso de hidrólisis-acidogénesis psicrófila

6.1	INTRODUCCIÓN	6-3
6.2	OBJETIVOS	6-5
6.3	MATERIALES Y MÉTODOS	6-5
6.3.1	Operación con almidón.....	6-5
6.3.2	Operación con gelatina.....	6-5
6.3.3	Análisis de la biomasa	6-6
6.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6-8
6.4.1	Operación con almidón.....	6-8
6.4.2	Operación con gelatina.....	6-18
6.5	CONCLUSIONES	6-23
6.6	REFERENCIAS.....	6-23

CAPÍTULO SEPTIMO. Conclusiones

CONCLUSIONES		7-1
CONCLUSIÓN.....		7-3
CONCLUSIONS.....		7-5

RESUMEN

En este trabajo se presenta el estudio del proceso de hidrólisis/acidogénesis de macromoléculas en un sistema anaerobio psicrofílico, seleccionándose dos sustratos modelo: almidón como ejemplo de carbohidratos y gelatina para el caso de proteínas. La investigación evalúa la influencia de parámetros operacionales y de diseño, analizándose además las características de la biomasa desarrollada en los experimentos.

En el capítulo 1 se presenta una revisión general del marco teórico que sustenta el trabajo desarrollado, indicando en primer lugar las características de las aguas residuales y el problema asociado a la fracción constituida por las macromoléculas. A continuación se describe el proceso de digestión anaerobia indicando sus fundamentos y aplicación al tratamiento de aguas residuales complejas, haciendo énfasis en la operación a baja temperatura. Finalmente, se detalla el empleo de los sistemas de membrana en los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales, resumiendo sus principales características.

Las metodologías, experimental y analítica, comunes para los experimentos realizados a lo largo de la investigación son descritas en el capítulo 2, presentando posteriormente en cada capítulo las pertinentes a alguna aplicación en particular.

En los capítulos 3 y 4 se aborda el proceso de hidrólisis/acidogénesis a baja temperatura aplicado a la degradación de carbohidratos. Para ello se utiliza almidón soluble de 160 kDa de peso molecular como molécula modelo, analizando aspectos operacionales y nutricionales. Así, en el capítulo 3 se estudia el proceso examinando cuatro configuraciones de reactor: en primer lugar un RCTA operado en forma tradicional; como segunda alternativa el mismo sistema pero operado como lecho ascendente con agitación mínima para aumentar el tiempo de residencia de la biomasa prescindiendo de un decantador secundario; y finalmente para cada caso, el acoplamiento de un sistema de ultrafiltración tangencial (UF) con el fin de aumentar el tiempo de residencia de moléculas de tamaño superior a 10 kDa resultantes de la hidrólisis incompleta del sustrato. El

estudio, que tuvo una duración de 308 días, permite desarrollar biomasa de elevada actividad hidrolítica, siendo capaz de trabajar eficientemente a VCO de hasta $24 \text{ g}_{\text{almidón}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$ (TRH 3 h y concentración de almidón 3 g/L), con al menos una eficiencia de degradación de almidón del 93% y 67% de acidificación. Los mejores resultados se obtienen con la configuración de lecho ascendente al desarrollarse una biomasa de mejor sedimentabilidad. El acoplamiento de un equipo de UF permite cumplir con los objetivos planteados, en relación a la obtención de un efluente fácilmente biodegradable rico en moléculas sencillas de bajo peso molecular, en este caso una mezcla de acetato, propionato y butirato.

En el capítulo 4 se considera el efecto de las limitaciones nutricionales, con énfasis en la disponibilidad de nitrógeno en el proceso de degradación de almidón. El estudio se lleva a cabo considerando la operación con TRH de 6 y 3 horas, estableciéndose diferentes condiciones nutricionales: una con la relación DQO/N de 700/5, 1,5 g/L de almidón y 12 mg/L de nitrógeno, denominada de referencia, y otras cuatro condiciones con cantidades variables de carbono y nitrógeno. Los resultados obtenidos indican que la eficacia del sistema está limitada por la cantidad de nitrógeno alimentado más que por la relación entre el carbono alimentado y el nitrógeno disponible, de manera que es posible obtener casi un 60% de solubilización (fracción que contiene moléculas de tamaño menor a 1 kDa) al operar con una VCO de $24 \text{ g}_{\text{almidón}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$, si el nitrógeno alimentado se mantiene en la concentración de referencia. Al aplicar una VCO de $12 \text{ g}_{\text{almidón}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$, sólo se solubiliza un 40% del sustrato si el nitrógeno es deficitario y cerca de un 70% si el nitrógeno se encuentra en la concentración adecuada (nivel de referencia). Adicionalmente, en este capítulo se comprueba que la adición de calcio mejora sustancialmente la sedimentabilidad de la biomasa presente.

En el capítulo 5 se presenta el proceso de hidrólisis/acidogénesis de proteínas, analizando la influencia del tiempo de residencia hidráulico en el comportamiento del reactor operado a baja temperatura. Para ello, se utilizó gelatina de 80-100 blooms (peso molecular aproximado de 20 kDa) como molécula modelo, considerando la operación con TRH de 12, 21 y 36 horas en un reactor de lecho ascendente; acoplando en los dos primeros casos un equipo de UF. Los resultados

indican que bajo las condiciones estudiadas la hidrólisis de la gelatina alcanza un máximo de 65% para un TRH de 36 horas y cerca de un 40% para un TRH de 12 horas. La amonificación y acidificación del sustrato también se ven afectados por dicho parámetro. Para un TRH de 12 horas, la distribución de tamaños moleculares del efluente muestra que la fracción superior a 10 kDa permanece inalterada, mientras que la fracción intermedia (1-10 kDa) es completamente transformada en compuestos de menor tamaño. El incremento del TRH hasta 36 horas, permite aumentar la degradación de la fracción recalcitrante, obteniendo un efluente con cerca de un 95% de moléculas solubles. La utilización de un sistema de UF mejora la eficiencia del proceso, obteniendo un efluente con cerca del 100% de moléculas de tamaño menor que 1 kDa. En este capítulo también se presentan las ventajas derivadas de aplicar la hidrólisis anaerobia como tratamiento previo, en un sistema convencional de lodos activos. Los resultados, basados en la aplicación de ensayos de OUR, indican que el pretratamiento aumenta notoriamente la fracción fácilmente biodegradable del residuo, pasando de un 26% (alimentación sin tratar) a un 42% (efluente TRH 12 horas) y 52% (efluente del sistema con TRH de 12 horas con el equipo de UF acoplado).

Finalmente, en el capítulo 6 se describen las características de la biomasa desarrollada en las operaciones descritas en los capítulos anteriores. El lodo pierde su capacidad metanogénica al operar a bajos TRH en un reactor tipo tanque agitado y alcanza valores de actividad hidrolítica y acidogénica elevados degradando almidón soluble de alto peso molecular a baja temperatura. En el reactor de lecho ascendente sometido a stress por deficiencia de nitrógeno, se formaron agregados estables tras adicionar calcio en la alimentación. Esta biomasa presenta un perfil de sedimentación similar al de los lodos metanogénicos utilizados como inóculo, alcanzando un IVL cercano a 50. Durante la operación con gelatina, aunque la formación de agregados es incipiente, se aprecian conglomerados que podrían corresponder a núcleos de agregados inmaduros, mezclados con flóculos de gran tamaño de apariencia más o menos compacta. La adición de calcio en este caso también resulta favorable, de manera que estos lodos presentan un valor de IVL bajo. La relación proteína/azúcares totales en los EPS extraídos, resulta mas elevada (2-4) en los lodos no granulares que la correspondiente a la biomasa agregada (0,8 – 1).

RESUMO

Neste traballo preséntase o estudo do proceso de hidrólise/acidoxénese de macromoléculas nun sistema anaerobio psicrófilo, seleccionándose dúas moléculas modelo: amidón como exemplo de carbohidratos e xelatina para o caso de proteína. A investigación evaluou a influencia de parámetros operacionais de deseño, analizándose ademais as características da biomasa desenrolada nos experimentos.

No capítulo 1 entrégase unha revisión xeral do marco teórico que sustenta o traballo desenrolado, presentando en primeiro lugar as características das augas residuais e o problema asociado á fracción constituída polas macromoléculas. A continuación descríbese o proceso de dixestión anaerobia indicando os seus fundamentos e aplicación ó tratamento de augas residuais complexas, facendo énfase na operación a baixa temperatura. Finalmente, detállase o emprego dos sistemas de membrana nos procesos de tratamento biolóxico de augas residuais, resumindo as súas principais características.

As metodoloxías, experimental e analítica, comúns para os diversos experimentos realizados ó longo da investigación son descritas no capítulo 2, presentando posteriormente en cada capítulo as pertinentes a algunha aplicación en particular.

Nos capítulos 3 e 4 abórdase o proceso de hidrólise/acidoxénese a baixa temperatura aplicado á degradación de carbohidratos. Para iso utilízase amidón soluble cun peso molecular de 160 kDa como molécula modelo, analizando aspectos operacionais e nutricionais. Así, no capítulo 3 estúdase o proceso examinando catro configuracións de reactor. En primeiro lugar un reactor RCTA operado de maneira tradicional; como segunda alternativa o mesmo sistema pero operado como leito ascendente con axitación mínima para aumentar o tempo de residencia da biomasa prescindindo dun decantador secundario; e finalmente para cada caso, o acoplamento dun sistema de ultrafiltración tanxencial co fin de aumentar o tempo de residencia de moléculas de tamaño superior a 10 kDa resultantes da hidrólise incompleta do substrato. O estudo, que tivo unha

duración de 308 días, permite desenrolar unha biomasa de elevada actividade hidrolítica, sendo capaz de traballar eficientemente a VCO de ata $24 \text{ g}_{\text{amidón}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$ con TRH de 3 h e 3 g/L de amidón, cunha eficiencia de degradación de amidón de polo menos o 93%. Os mellores resultados obtéñense coa configuración de leito ascendente ó desenrolarse unha biomasa de mellor sedimentabilidade. O acoplamento do equipo de ultrafiltración tanxencial permite cumprir cos obxectivos plantexados, en relación á obtención dun efluente facilmente biodegradable rico en moléculas sinxelas de baixo peso molecular, neste caso unha mestura de acetato, propionato e butirato.

No capítulo 4 considérase o efecto das limitacións nutricionais, con énfase na dispoñibilidade de nitróxeno. O estudo lévase a cabo considerando a operación con TRH de 6 e 3 horas, establecéndose diferentes condicións nutricionais: unha coa relación DQO/N de 700/5, 1,5 g/L de amidón e 12 mg/L de nitróxeno, denominada de referencia; e outras catro condicións con cantidades variables de carbono e nitróxeno. Os resultados obtidos indican que a eficiencia do sistema está limitada pola cantidade de nitróxeno alimentado máis que pola relación entre o carbono alimentado e o nitróxeno dispoñible, de maneira que é posible obter case un 60% de solubilización (fracción que contén moléculas de tamaño menor a 1 kDa) ó operar cunha VCO de $24 \text{ g}_{\text{amidón}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$ se o nitróxeno alimentado mantense na concentración de referencia. Ó aplicar unha VCO de $12 \text{ g}_{\text{amidón}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$ só se solubiliza un 40% se o nitróxeno é deficitario e preto dun 70% se o nitróxeno se encontra en cantidades axeitadas (nivel de referencia). Adicionalmente, neste capítulo contéplase a adición de calcio co fin de mellorar a sedimentabilidade da biomasa presente.

No capítulo 5 preséntase o proceso de hidrólise/acidoxénese de proteínas, analizando a influencia do tempo de residencia hidráulico no comportamento do reactor operado a baixa temperatura. Para iso utilízase xelatina de 80-100 blooms (peso molecular aproximado de 20 kDa) como molécula modelo, considerando a operación con TRH de 12, 21 e 36 horas nun reactor de leito ascendente; acoplado nos dous primeiros casos un equipo de ultrafiltración tanxencial. Os resultados indican que baixo as condicións estudadas a hidrólise da xelatina alcanza un máximo de 65% para un TRH de 36 horas e preto dun 40%

para TRH de 12 horas. A amonificación e acidificación do substrato tamén se ven afectados por dito parámetro. Para un TRH de 12 horas, a distribución de tamaños moleculares do efluente mostra que a fracción superior a 10 kDa permanece inalterada, mentres que a fracción intermedia (1-10 kDa) foi completamente transformada en compostos de menor tamaño. O incremento do TRH ata 36 horas, permite aumentar a degradación da fracción recalcitrante, obténdose un efluente con preto dun 95% de moléculas solubles. A utilización dun sistema de UF mellora a eficacia do proceso, obténdose un efluente con preto do 100% de moléculas de tamaño menor que 1 kDa. Neste capítulo tamén se presentan as vantaxes derivadas de aplicar a hidrólise anaerobia como tratamento previo, nun sistema convencional de lamas activas. Os resultados, baseados na aplicación de ensaios de OUR, indican que o pretratamento aumenta notoriamente a fracción facilmente biodegradable do residuo, pasando dun 26% (alimentación sen tratar) a un 42% (efluente TRH 12 horas) e 52% (efluente do sistema con TRH 12 horas con acoplamento dun sistema de ultrafiltración tanxencial).

Finalmente, no capítulo 6 descríbense as características da biomasa desenrolada nas operacións descritas nos capítulos anteriores. A lama perde a súa capacidade metanoxénica ó operar a baixos TRH nun reactor tipo RCTA e alcanza valores de actividade hidrolítica e acidoxénica elevados degradando amidón soluble de alto peso molecular a baixa temperatura. No reactor de leito ascendente sometido a stress por deficiencia de nitróxeno, formáronse agregados estables tras engadir calcio na alimentación. Esta biomasa presenta un perfil de sedimentación similar á das lamas metanoxénicas utilizadas como inóculo, alcanzando un IVL próximo a 50. Durante a operación con xelatina, aínda que a formación de agregados é incipiente, aprécianse conglomerados que poderían corresponder a núcleos de agregados inmaduros, mesturados con flóculos de gran tamaño de aparencia máis ou menos compacta. A adición de calcio neste caso tamén resulta favorable, de maneira que estas lamas presentan, do mesmo xeito, un valor de IVL baixo. A relación proteína/azucres totais nos EPS extraídos, resulta máis elevada (2-4) nas lamas non granulares que a correspondente á biomasa agregada (0,8-1).

SUMMARY

This study reports the analysis of the hydrolysis/acidogenesis process for macromolecules in an anaerobic psychrophilic system, focusing on two model molecules: starch as an example of polysaccharides and gelatin for the case of proteins. In this research the influence of operational and design parameters were evaluated, and included a characterization of the biomass produced.

Chapter 1 covers a general review of the theory underlining the research completed in this work, beginning with a description of wastewaters and the problem associated with the macromolecular fraction. This is followed by a description of the anaerobic digestion process outlining its fundamental principles and its application to complex wastewaters, with a particular emphasis in low temperature processes. Finally, the use of membrane systems in biological wastewaters treatments is described, summarizing its principal features.

The methodologies, experimental and analytical procedures, common to all experiments completed in this research are presented in Chapter 2, describing in subsequent chapters the ones required for each specific application.

Chapters 3 and 4 cover low temperature hydrolysis/acidogenesis processes as used for the degradation of carbohydrates. This was done analyzing operational and nutritional factors using soluble starch with a 160 kDa molecular weight as a model. Four reactor design configurations are analyzed in Chapter 3: First, a CSTR operating in conventional mode; next, the same unit but operated as an ascending fluidized bed with minimum agitation to increase the biomass residence time and thus eliminating the need for a secondary decanter unit, and finally the coupling to each of these units to a tangential ultrafiltration system with the goal of increasing the residence time for molecules larger than 10 kDa resulting from the incomplete substrate hydrolysis. This 308 d study, allowed the development of a biomass with elevated hydrolytic activity, able to operate at an organic loading rate (OLR) of $24 \text{ g}_{\text{starch}}/\text{L}_{\text{reactor}}\text{d}$ with a hydraulic residence time (HRT) equal to 3 h and a concentration of 3 g/L of starch, reaching a starch

degrading efficiency no less than 93%. The best results were obtained with the ascending fluidized bed configuration as it yielded a biomass with superior sedimentation ability. The coupling with a tangential ultrafiltration system allowed meeting operational objectives, i.e., producing an easily biodegradable effluent rich in simple low molecular weight compounds consisting largely of a mixture of acetate, propionate and butyrate.

Chapter 4 focuses on the effect of nutritional content, with emphasis on nitrogen availability. This study was completed considering operating the reactor at HRT between 6 and 3 h, establishing distinct nutritional conditions: one with the COD/N ratio of 700/5, 1.5 g/L starch and 12 mg/L nitrogen defined as the reference condition; and an additional four with variable carbon and nitrogen amounts. The results obtained showed that the efficiency of the system is limited more by the amount of nitrogen fed than by the relation between carbon feed and available nitrogen, making it feasible to achieve a solubilization (fraction containing molecules smaller than 1 kDa) approaching 60% when operating with an OLR of $24 \text{ g}_{\text{starch}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$ if the nitrogen supplied is maintained at the reference concentration. When using an OLR of $12 \text{ g}_{\text{starch}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$, only 40% is solubilized if nitrogen is deficient and approaches 70% if nitrogen is available in adequate amounts (reference level). This chapter covers also the addition of calcium to improve the sedimentation of the biomass produced.

Chapter 5 describes the hydrolysis/acidogenesis process for proteins, analyzing the HRT effect on the behavior of low temperature operating reactors. This was studied using gelatin (80-100 bloom, molecular weight about 20 kDa), considering operations with HRT equal to 12, 21 and 36 h in an ascending fluidized bed reactor, coupled in the first two cases to a tangential ultrafiltration unit. The results obtained showed that under the conditions studied, the hydrolysis of gelatin reached a 65% maximum for an HRT of 36 h and approached 40% for an HRT of 12 h. Substrate ammonification and acidification were also affected by this parameter. For a 12 h HRT, the molecular weight distribution showed that the fraction larger than 10 kDa remained the same, while the intermediate fraction (1-10 kDa) was converted into lower molecular compounds. Increasing HRT to 36 h, allowed the degradation of the recalcitrant fraction and yielding an effluent

approaching 95% in the concentration of soluble molecules. The use of an ultrafiltration system improved the process efficiency, yielding an effluent with almost 100% of molecules smaller than 1 kDa. This chapter also describes the advantages derived from using anaerobic hydrolysis as pretreatment to a conventional activated sludge system. The results, based on the application of OUR tests, indicated that the pretreatment increased significantly the easily biodegradable fraction from 26% (untreated feed) to 42% (effluent with a 12 h HRT) and 52% (effluent with a 12 h HRT in a system attached to an ultrafiltration system).

Finally, Chapter 6 summarizes the characteristics of the biomass produced in the processes described in previous chapters. The sludge lost its methanogenic capacity when operating the CSTR at low HRT values and reached high hydrolytic and acidogenic activity degrading soluble starch with large molecular weight at low temperature. The ascending fluidized bed reactor subjected to nitrogen deficiency stress produced stable aggregates when calcium was added to the feed. This biomass had a sedimentation profile similar to the methanogenic sludge used for inoculation, reaching a sludge volumetric index (SVI) value approaching 50. During tests with gelatin, although the formation of aggregates was incipient, it was possible to observe agglomerates that could reflect immature aggregate nuclei mixed also with large size flocs having a more or less compact appearance. Adding calcium helped in this case also, yielding sludge with low SVI values. The protein/total sugar fraction in the EPS extracted, was higher (2-4) in the non-granulated sludge than in the one corresponding to the aggregated biomass (0.8-1).

OBJETIVOS

En la composición de las aguas residuales, tanto de origen industrial como urbano, juega un papel importante la fracción más lentamente biodegradable que, en muchas ocasiones, se encuentra en la fracción particulada o coloidal. En particular las moléculas poliméricas de masa molecular elevada no pueden ingresar directamente a la célula para ser metabolizadas, requiriendo la acción de enzimas extracelulares de acción específica que tienen como función hidrolizar estas macromoléculas.

En muchas ocasiones la eficiencia de las plantas de tratamiento se ve seriamente afectada por la necesidad de implementar condiciones operativas que permitan la eliminación de material lentamente biodegradable, como por ejemplo tiempos de residencia elevados en el caso de aguas residuales con elevado contenido de material particulado. En estos casos, podría resultar de interés la incorporación, a la línea de tratamiento, de unidades específicas que logren una hidrólisis rápida de las macromoléculas, facilitando por tanto la operación posterior.

El proceso de digestión anaerobia es una tecnología consolidada, siendo utilizado crecientemente como método de tratamiento de efluentes, si bien su aplicación a instalaciones a gran escala está restringida principalmente a la operación en rango mesófilo (y en menor escala termófilo) o para el tratamiento de aguas urbanas generadas en climas tropicales. Sin embargo, hoy en día existe un gran interés en extender su operatividad a otros rangos de temperatura y a otras aplicaciones no metanogénicas.

La presente Tesis tiene como objetivo principal el estudio del proceso de hidrólisis y acidificación psicrófila de moléculas complejas en sistemas anaerobios, utilizando almidón soluble y gelatina, ambos de elevado peso molecular, como compuestos modelos de carbohidratos y de moléculas proteicas. De esta manera, se propone que en los sistemas de tratamiento considerados se obtenga un efluente rico en moléculas solubles de bajo peso molecular, que puedan ser fácilmente metabolizadas en una segunda etapa de tratamiento.

Con este propósito se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Establecer la influencia de la temperatura en el proceso de hidrólisis/acidogénesis anaerobia de almidón y gelatina, comparando los resultados obtenidos al trabajar a 15 y 37°C (capítulos 3 y 5).
- Desarrollar biomasa capaz de degradar eficientemente moléculas de elevado peso molecular operando a baja temperatura (capítulos 3, 4 y 5).
- Estudiar el comportamiento obtenido al operar con distintas configuraciones de reactor (RCTA, lecho ascendente y reactor de membrana), para seleccionar las mejores condiciones de proceso en el caso de utilizar almidón como sustrato (capítulo 3).
- Determinar el efecto de las limitaciones nutricionales, con énfasis en la disponibilidad de nitrógeno, en el proceso de hidrólisis/acidogénesis anaerobia de almidón (capítulo 4).
- Evaluar la respuesta obtenida en el proceso de hidrólisis/acidogénesis anaerobia de gelatina en función del TRH de operación y de la configuración de reactor utilizada (reactor de lecho ascendente sin y con equipo de ultrafiltración) (capítulo 5).
- Caracterizar la biomasa formada en los procesos estudiados, considerando aspectos tanto físicos como metabólicos (capítulo 6).

CAPÍTULO PRIMERO

Antecedentes generales

RESUMEN

En este capítulo se revisa el marco teórico que sustenta esta Tesis. En primer lugar se presenta una visión de la caracterización de aguas residuales desde el punto de vista del tamaño molecular de sus distintos componentes, mostrando el problema relacionado con la fracción constituida por las macromoléculas. Posteriormente, se describe el proceso de digestión anaerobia y su utilización en el tratamiento de aguas residuales complejas, profundizando en la operación en rango psicrófilo. Finalmente, se discute el efecto de la configuración de reactor utilizada, sobre la eficiencia de degradación obtenida para un proceso en particular, destacando el empleo de los sistemas de membrana en los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales, como tecnología innovadora.

INDICE

1.1	MACROMOLÉCULAS EN AGUAS RESIDUALES	1-3
1.2	EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA	1-4
1.2.1	<i>Hidrólisis y acidogénesis de macromoléculas</i>	<i>1-6</i>
1.2.2	<i>Mecanismos asociados al proceso de hidrólisis de sustratos complejos ...</i>	<i>1-7</i>
1.2.3	<i>Efecto de la temperatura.....</i>	<i>1-10</i>
1.2.4	<i>Efecto del pH.....</i>	<i>1-11</i>
1.2.5	<i>Efecto de la estructura del sustrato.....</i>	<i>1-12</i>
1.2.6	<i>Modelación del proceso de hidrólisis en sistemas anaerobios</i>	<i>1-14</i>
1.3	REACTORES DE MEMBRANA	1-15
1.4	REFERENCIAS	1-19

1.1 Macromoléculas en aguas residuales

Cuando se trata de caracterizar las aguas residuales suelen utilizarse parámetros como Demanda Química de Oxígeno (DQO), contenido de carbono orgánico (TOC), nitrógeno Kjeldahl (NTK), etc, diferenciando rara vez entre sedimentable /no sedimentable o filtrado/no filtrado. Algunos autores han caracterizado las aguas residuales de acuerdo al tamaño de cada fracción. De esta manera, Sophonsiri y Morgenroth (2004) determinaron que una fracción importante de la materia orgánica presente en las aguas residuales urbanas, industriales y agrícolas tenía un tamaño superior a los 1000 Da, correspondiente a las llamadas macromoléculas (Confer y Logan, 1997b), aunque la distribución de dichas partículas en el rango estudiado (1000 Da – 63 μm) variaba según el tipo de agua residual analizada. Por otro lado, Ginestet *et al.* (2002) caracterizaron física y biológicamente las aguas residuales de 7 plantas de tratamiento considerando tres fracciones: sedimentable o particulada, coloidal y soluble. Los resultados indicaron que la fracción sedimentable contenía entre un 45-50% de DQO lentamente hidrolizable y la fracción coloidal contenía cantidades muy variables de moléculas fácilmente hidrolizables (6-82%) o lentamente hidrolizables (0-70%). Se ha determinado que las moléculas de tamaño superior a los 50-100 μm suelen ser retiradas en los sistemas de tratamiento primarios (Levine *et al.*, 1985), correspondiendo a lo denominado “sedimentable”. La fracción coloidal, por su parte, puede poseer un tamaño molecular que va desde los 0,01 y 1 μm (Quesada-Perez *et al.*, 2003). Un estudio similar determinó la distribución de tamaños moleculares de las aguas residuales de la ciudad de Roma (Marani *et al.*, 2004), determinando que la fracción denominada supracoloidal, que no es retirada en el tratamiento primario, se caracteriza por su baja biodegradabilidad. Aunque la clasificación de las fracciones varía entre los diversos autores (Mahmoud *et al.*, 2003), es claro que las fracciones coloidal y sedimentable representan fracciones que pueden llegar a ser difícilmente degradables para los microorganismos involucrados, puesto que las moléculas de tamaño superior a 1000 Da no pueden ingresar directamente a la célula para ser metabolizadas, requiriendo la acción de enzimas extracelulares de acción específica que tienen como función hidrolizar estas macromoléculas (Eastman y Ferguson, 1981).

1.2 El proceso de digestión anaerobia

Si bien es cierto, el proceso de digestión anaerobia inicialmente fue aplicado casi exclusivamente al tratamiento de la fracción biodegradable de los residuos municipales líquidos y sólidos, lodos y residuos agroindustriales, hoy en día esta alternativa de tratamiento se ha consolidado, principalmente debido al desarrollo de los reactores UASB en Holanda en la década de los 80. De esta manera, a la fecha se tiene un conocimiento extenso acerca de su aplicabilidad, incluyendo aguas residuales que contienen compuestos tóxicos y recalcitrante como los provenientes de la industria química, petroquímica y de pulpa/papel (Field, 2002).

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que, a través de una serie de reacciones bioquímicas, ciertos microorganismos transforman la materia contaminante en un gas cuyos principales componentes son CH₄ y CO₂ (biogas). Este proceso es uno de los mecanismos más frecuentemente utilizados por la naturaleza para degradar las sustancias orgánicas. De hecho, esta conversión se produce en diversos ambientes, ya sean naturales, como los sistemas gastrointestinales (rumen), los sedimentos marinos de los ríos y lagos, las fuentes termales, los volcanes o bien en sistemas controlados como los digestores o fermentadores anaerobios y se presume sería el proceso más primitivo y antiguo de degradación natural, al haberse encontrado bacterias fósiles correspondientes a períodos geológicos de 3,1 a 3,4 · 10⁹ años de antigüedad, época en que el oxígeno era sumamente escaso en la atmósfera (Valles *et al.*, 1980).

Esta transformación de sustancias complejas a metano y dióxido de carbono se lleva a cabo por un gran número de bacterias que actúan sinérgicamente, aunque a distintas velocidades, distinguiéndose primordialmente cuatro etapas (Siegrist *et al.*, 1993; Kalyuzhnyi *et al.*, 2000). La etapa inicial consiste en la hidrólisis de las moléculas de mayor tamaño a sus constituyentes individuales (monosacáridos en el caso de carbohidratos, aminoácidos para las proteínas y ácidos grasos en el caso de lípidos). La etapa posterior es llevada a cabo por las bacterias llamadas acidogénicas o fermentativas en la cual componentes orgánicos solubles, incluyendo los productos de la etapa de hidrólisis, son convertidos en ácidos orgánicos, alcoholes, hidrógeno y dióxido de carbono. La tercera etapa, conocida como acetogénica, la llevan a cabo las bacterias del mismo nombre (que deben

existir en simbiosis con las metanogénicas utilizadoras de hidrógeno) oxidando los alcoholes y ácidos grasos a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Finalmente, en la última etapa, denominada metanogénica, las bacterias del mismo nombre (acetoclásticas y utilizadoras de hidrógeno) transforman acetato, hidrógeno y dióxido de carbono a metano. En todo el proceso anaerobio sólo la etapa metanogénica es anaerobia estricta y, en relación con las otras etapas, ésta es relativamente lenta, siendo generalmente considerada como la que controla la velocidad del proceso. Sin embargo, en el caso de sustratos complejos, normalmente la etapa limitante es la hidrolítica. En la Figura 1.1 se presenta un esquema del proceso de digestión anaerobia y la interrelación entre las etapas descritas.

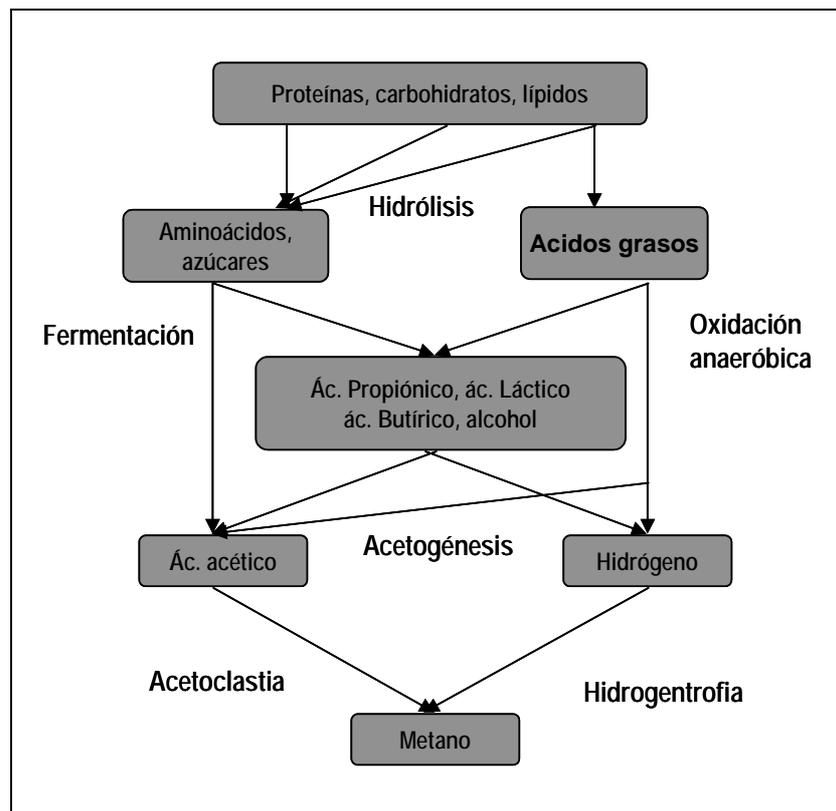


Figura 1.1. Esquema del proceso de digestión anaerobia y sus etapas.

1.2.1 Hidrólisis y acidogénesis de macromoléculas

La hidrólisis de los polímeros naturales como hidratos de carbono, proteínas y lípidos, entendida como la conversión de moléculas orgánicas complejas en sus componentes más simples, es realizada a través de enzimas sintetizadas por los microorganismos. Estas enzimas, denominadas hidrolíticas, pueden ser excretadas al medio o estar asociadas a la envoltura externa celular (Nybroe *et al.*, 1992; Goel *et al.*, 1997; Confer y Logan, 1997b); en el caso de polímeros no solubles, como los residuos sólidos, se ha observado la adhesión de los microorganismos a las partículas sólidas (Chyi y Dague, 1994; Sanders *et al.*, 2000). Por otra parte, la digestión anaerobia de sólidos biológicos viables, como los lodos activos, requieren un mecanismo de conversión adicional, denominado lisis o muerte celular, antes de que el material orgánico pueda ser hidrolizado (Pavlostathis y Giraldo Gomez, 1991). Los productos generados de la hidrólisis deben ingresar, a continuación, hacia el interior de la célula a través de la membrana celular para ser metabolizados. Existe una gran variedad de mecanismos de transporte los cuales varían en su especificidad y costo energético asociado, clasificándose, en términos generales, en difusión simple, difusión facilitada y transporte activo (Martin, 1994).

En la segunda fase del proceso de degradación anaerobia, ocurren las reacciones de fermentación (o acidogénesis), en los cuales los distintos monómeros son metabolizados a productos intermediarios más simples, principalmente acetato, propionato y butirato, y en menor proporción CO₂ y H₂.

La fermentación de aminoácidos, productos de la hidrólisis de proteínas, puede llevarse a cabo por medio del proceso de oxidación anaerobia unida a la producción de hidrógeno lo que requiere la presencia de bacterias utilizadoras de hidrógeno (Ramsay y Pullammanappallil, 2001), o alternativamente, los aminoácidos pueden ser degradados en pares por medio de la reacción de Stickland en donde un aminoácido es desaminado oxidativamente y los electrones producidos son transferidos a otro aminoácido que es reductivamente desaminado (Nisman, 1954). Es importante mencionar que la fermentación de aminoácidos genera una alta concentración de amonio, siendo este un compuesto inhibidor de la flora metanogénica (Lokshina *et al.*, 2003).

En el caso de los lípidos, sus productos de hidrólisis (glicerol, colina y ácidos grasos de cadena larga), son oxidados anaeróbicamente a ácidos grasos volátiles (C₂ a C₅), mediante el proceso denominado β-oxidación (McInerney, 1988), dando como principal producto ácido acético. Este proceso de metabolización es lento, debido a la baja solubilidad de los compuestos lipídicos y, bajo ciertas condiciones, los productos de degradación pueden ser tóxicos para la población acetogénica y metanogénica (Komatsu *et al.*, 1991; Lalman y Bagley, 2002). La reacción de β-oxidación es inhibida por niveles altos de hidrógeno (Novak y Carlson, 1970), de manera que los desechos y aguas residuales con un elevado contenido lipídico deben ser tratados en sistemas metanogénicos no siendo adecuados los procesos en dos fases (Demirel y Yenigun, 2002).

Finalmente, la fermentación de azúcares solubles es llevada a cabo, principalmente, a través de la vía de Embden-Meyerhoff (para la fermentación de glucosa) siendo el piruvato el principal intermediario. A partir de este compuesto y dependiendo del microorganismo involucrado y las condiciones ambientales se obtendrán distintos productos, siendo los mas habituales el etanol, acetato, hidrógeno y CO₂.

1.2.2 Mecanismos asociados al proceso de hidrólisis de sustratos complejos

Según Batstone *et al.* (2000), en el proceso de digestión anaerobia existen principalmente tres mecanismos para la liberación de enzimas y la posterior hidrólisis de los sustratos complejos,

- a. los microorganismos secretan enzimas al medio líquido, donde se adsorben en las partículas o sustrato para liberar un sustrato soluble (Jain *et al.*, 1992)
- b. los microorganismos se adhieren a las partículas, secretan las enzimas en la vecindad de la partícula y luego los microorganismos se benefician de los sustratos disueltos liberados (Vavilin *et al.*, 1996)
- c. los microorganismos tienen enzimas adheridas que tienen la doble capacidad de actuar como transportador-receptor hacia el interior de la

célula. Por supuesto, este mecanismo requiere que el microorganismo se adhiera a la superficie de la partícula.

Debido a que los mecanismos b) y c) requieren un contacto íntimo microorganismo-partícula y que solo existen referencias para el tipo b) se ha asumido que este mecanismo describe de mejor manera el proceso de hidrólisis de sustratos complejos en el proceso de digestión anaerobia. Ahora, junto a las reacciones de hidrólisis planteadas, los mecanismos propuestos también incluyen otros procesos como son la producción de enzima y los procesos de difusión de enzimas, de microorganismos y de los productos de la hidrólisis. Esto último puede llegar a constituir un paso limitante en el caso de trabajar con un elevado contenido de sólidos, por ejemplo 35-40% en el caso de desechos de frutas y vegetales (Kalyuzhnyi *et al.*, 2000).

Goel *et al.* (1998a) investigaron la cinética de hidrólisis de sustratos poliméricos disueltos. Sus resultados mostraron que la actividad enzimática estaba localizada en el lodo por lo que las macromoléculas deberían difundir hasta él para ser hidrolizadas. Este estudio se asemeja al tercer mecanismo descrito (c), sin embargo, como las enzimas son producidas por el lodo, la concentración y actividad de ese lodo es igualmente importante para los mecanismos a) y b) planteados.

Otras investigaciones realizadas, considerando material particulado, demostraron que la velocidad de hidrólisis estaba determinada por el tamaño de partícula o por el número de sitios de adsorción existentes en la superficie de la partícula (Chyi y Dague, 1994; Veecken y Hamelers, 1999). Mas aún, observaciones microscópicas mostraron que las partículas de sustrato son inmediatamente colonizadas cuando se encuentran en un digestor (Hobson, 1987), las cuales secretaban enzimas extracelulares. En ensayos conducidos por Philip *et al.* (1993), realizados con lodos de fosa séptica, se determinó la presencia de actividad de lipasas, proteasas y celulasas en el lodo, no detectándose actividad en el medio líquido. En los mismos ensayos, se analizaron muestras de lodo previamente lavadas, encontrándose que el 50% de la actividad enzimática permanecía fuertemente ligada al lodo, independientemente de si el lodo había sido lavado con agua destilada, solución buffer o Tritón X100.

Al considerar los sustratos tipificados individualmente, es decir, proteínas, carbohidratos y lípidos, se encuentra que existe una serie de antecedentes que describen su hidrólisis enzimática. Las proteínas son hidrolizadas en el proceso de digestión anaerobia mediante dos grupos enzimáticos, denominados proteasas y peptidasas, también llamadas proteinasas (McInerney, 1988). A partir de experimentos realizados con cultivos puros, se ha visto que los microorganismos comienzan a producir proteinasas cuando la concentración de aminoácidos y compuestos inorgánicos en el medio acuoso es baja o cuando la concentración de proteínas y péptidos es alta (Glenn, 1976). De esta manera, la producción de proteinasas bacterianas puede ser inhibida por componentes como los aminoácidos, niveles elevados de fosfato y glucosa (Breure *et al.*, 1986).

Los carbohidratos están formados a partir de la unión de monosacáridos por medio de enlaces glicosídicos, y su hidrólisis da origen a una gran variedad de polisacáridos cuya degradación requiere la acción de diversos sistemas enzimáticos con especificidades y modos de acción diferentes (Warren, 1996). Así, por ejemplo la degradación de celulosa es llevada a cabo por una mezcla enzimática compuesta por exo-glucanasas, endo-glucanasas y celobiasas, siendo esta mezcla comúnmente denominada celulasas. Las quitinasas hidrolizan la quitina y el quitosano; y el almidón requiere de la acción de una compleja mezcla enzimática formada por α y β amilasas, glucoamilasas y glucanasas. Si bien es cierto, no se ha determinado que la presencia de aminoácidos ejerza algún efecto negativo sobre la actividad enzimática (Glenn, 1976), se encontró que el amonio puede inhibir la fermentación de carbohidratos (Fujishima *et al.*, 2000).

Los lípidos generalmente están presentes en la forma de triacilglicéridos, siendo hidrolizados a glicerol y una mezcla de tres ácidos grasos de cadena larga. Este proceso es llevado a cabo por enzimas denominadas comúnmente lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas); este tipo de enzima actúa solo en la interfase agua-aceite y no en el medio (Sharma *et al.*, 2001). Para el caso del proceso de digestión anaerobia, debido a que existe una mezcla de sustrato y lodo y a que las lipasas tienen una muy baja afinidad por sustrato, estas se adsorben fácilmente en la superficie del lodo, lo que dificulta el establecimiento de un buen contacto entre las lipasas y la interfase grasa-agua. Por otro lado, los ácidos grasos de

cadena larga pueden ser tóxicos debido a que se absorben sobre la superficie celular bloqueando los mecanismos de transporte (Galbraith y Miller, 1973; Rinzema *et al.*, 1994).

1.2.3 Efecto de la temperatura

Si bien es cierto, hasta hace algunos años se consideraba que los sistemas de tratamiento anaerobios solo eran eficientes operando a temperaturas elevadas, rango mesófilo o termófilo, en la última década se han llevado a cabo importantes esfuerzos para extender la aplicabilidad de esta tecnología al rango psicrófilo intentando ser una solución alternativa para las aguas residuales urbanas y diluidas, área tradicionalmente cubierta por los procesos aerobios.

Singh y Viraraghavan (2003) determinaron el efecto de la temperatura en el proceso anaerobio aplicado a aguas urbanas, estudiando el rango de 6 a 32°C. Los resultados indicaron que es posible obtener eficiencias satisfactorias de remoción de DQO y sólidos suspendidos operando con TRH de 6 a 11 horas con temperaturas de al menos 11 °C. Sin embargo, en condiciones psicrófilas la velocidad de hidrólisis es más lenta y por lo tanto la presencia de material complejo o particulado puede constituir un inconveniente en el proceso global de degradación, provocando el deterioro de la biomasa por la acumulación de sólidos (Mahmoud *et al.*, 2003).

La generación de metano también se ve fuertemente afectada en operaciones a baja temperatura (Kashyap *et al.*, 2003). De esta manera, a pesar de que se ha constatado la producción de metano en un amplio rango de temperatura (0 a 97°C), su productividad disminuye notoriamente. Kanwar y Guleri (1994) observan una disminución en la época invernal de hasta un 70% del biogas producido. En otro trabajo, Agrawal *et al.* (1997) reportan que la velocidad de producción de gas se reduce en un 78% al disminuir la temperatura desde 27 a 10°C.

Por otra parte, también se ha establecido que las bacterias son capaces de adaptarse, pudiendo desarrollarse adecuadamente a temperaturas menores a su rango óptimo, pero requiriendo un tiempo de residencia de sólidos de aproximadamente el doble que en condiciones mesófilas (Kashyap *et al.*, 2003;

Mahmoud *et al.*, 2004) para llevar a cabo convenientemente el proceso de hidrólisis. Así, Sutter y Wellinger (1985) establecieron que la cantidad de metano producido a 20°C y TRS de 45-50 días es comparable con la obtenida en condiciones mesófilas y con la mitad del TRS.

El deterioro en la actividad metabólica de las bacterias producto de la disminución de la temperatura del sistema podría deberse al tipo de microorganismo involucrado, pues al parecer en la población existirían bacterias psicotróficas (organismos, también llamados psicotolerantes, cuya temperatura óptima es mayor que 20°C pero que pueden actuar adecuadamente a baja temperatura, sin ser parte natural de dichos ambientes (Gounot, 1986)), las que tendrían que adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Dentro de los cambios asociados al mecanismo de adaptación se encuentran el ajuste en la composición lipídica de la membrana con el fin de mantener la permeabilidad de protones constante en un amplio rango de temperaturas (Albers *et al.*, 2001; Konings *et al.*, 2002). Por otro lado, los organismos propiamente psicrófilos no serían capaces de sobrevivir a temperaturas mayores a 20°C, pues a pesar de que el incremento de temperatura disminuye el tiempo de duplicación, también induce stress celular lo que lleva a tener cultivos con baja densidad y pobre producción enzimática (Gerday *et al.*, 2000).

Finalmente, a temperaturas bajas tiene lugar una menor solubilidad de los compuestos gaseosos, el aumento de la viscosidad de los líquidos y un efecto cinético negativo sobre las reacciones químicas y biológicas que las hace más lentas que en condiciones mesófilas (Lettinga *et al.*, 2001). La afinidad de los microorganismos por sus sustratos también disminuye (Nedwell, 1999).

1.2.4 Efecto del pH

Aunque cada fase del proceso de degradación presenta un óptimo de pH particular, dependiendo de la población bacteriana involucrada, en términos generales se opta por operar en el rango neutro de pH con el fin de asegurar las condiciones adecuadas para el desarrollo de las bacterias metanogénicas, consideradas las más sensibles del proceso. Sin embargo, en el caso de pretender favorecer la fase de hidrólisis/acidogénesis, es posible operar a pH inferiores (5-

5,5 o menores aún), debido a que los microorganismos metanogénicos pierden su actividad en dichas condiciones.

Chyi y Levine (1992) exploraron el pH óptimo para la hidrólisis de partículas de celulosa comercial, obteniendo como resultado un valor entre 5,2 y 6,0. Paralelamente, se buscó el TRH óptimo, estudiando el intervalo entre 24 y 72 horas. En el caso de un sustrato complejo, Perot *et al.* (1988) consideraron el efecto del pH, temperatura y grado de agitación en el proceso de hidrólisis-acidificación de una mezcla de lodo primario y lodo activo. Los óptimos obtenidos fueron de pH 6,8 (rango estudiado entre 5 y 7); temperatura de 55°C (rango estudiado entre 35 y 55°C) y agitación de 545 rpm (rango estudiado entre 450 y 650 rpm). Considerando la presencia de lípidos, estudios llevados a cabo por Komatsu *et al.* (1991) determinaron que la fase de β -oxidación se ve favorecida por valores de pH levemente superiores al neutro. Por último, Yu y Fang (2003) analizaron la influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis/acidogénesis de gelatina determinando que el efecto más significativo lo ejerce el pH, encontrando el óptimo a un valor de pH cercano a 6,0.

1.2.5 Efecto de la estructura del sustrato

Las aguas residuales pueden describirse en base a su contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos, aunque la proporción de estos componentes y sus distintas estructuras, además de características físicas como pH, temperatura o contenido de sales, metales o componentes recalcitrantes, determinarán en mayor o menor medida su degradabilidad. Por ello, la estructura del sustrato puede establecer las limitaciones del proceso de degradación. Se han llevado a cabo investigaciones con diversos sustratos con el fin de establecer las condiciones más favorables para llevar a cabo eficientemente su metabolización, considerando moléculas modelo, mezclas de sustratos definidos o sustratos complejos como los lodos primarios o secundarios aerobios.

Por ejemplo, Maharaj y Elefsiniotis (2001) estudiaron la hidrólisis-acidificación de una mezcla de residuo municipal con agua residual industrial rica en almidón, en proporciones iguales. Así, determinaron que la hidrólisis de las moléculas de proteína se vio inhibida por la presencia de almidón, en el caso de los ensayos a

bajas temperaturas (8 y 16°C), logrando revertir la situación al trabajar con prolongados TRH (60 horas y 25°C). Este resultado concuerda con el trabajo realizado por Breure *et al.* (1986). Gavala y Lyberatos (2001) realizaron ensayos estudiando la influencia de la aclimatación de biomasa para la degradación de lactosa y gelatina y una mezcla de ambas, encontrando notables diferencias en la velocidad máxima de consumo del sustrato y estequiometría de la reacción.

Investigaciones realizadas considerando la presencia de lípidos, han buscado minimizar el efecto tóxico de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) mediante el uso de surfactantes (Nakhla *et al.*, 2003) o bentonita (Beccari *et al.*, 2001). También se ha establecido el efecto beneficioso de la presencia de hierro como agente protector de la biomasa frente a los AGCL (Li y Wrenn, 2004). En el caso de los carbohidratos, generalmente el sustrato modelo seleccionado ha sido celulosa (Chyi y Dague, 1994; Harada *et al.*, 1994; Valentini *et al.*, 1997). La degradación de proteína ha sido estudiada utilizando principalmente gelatina como molécula modelo (Fang y Yu, 2002; Yu y Fang, 2003) o caseína (Ramsay y Pullammanappallil, 2001).

Finalmente, para el caso de sustratos complejos, Miron *et al.* (2000) analizaron el efecto del tiempo de residencia de sólidos (TRS) en la degradación de lodo primario, en función de la degradación de sus componentes principales, lípidos, carbohidratos y proteínas. Los resultados indican que la hidrólisis de los dos primeros se incrementa en función del TRS, mientras que para el caso de las proteínas, sería necesario trabajar en condiciones metanogénicas (TRS > 8 días).

Algunos autores han considerado el estudio del proceso de degradación desde el punto de vista del tamaño molecular de los sustratos, siendo todos ellos realizados para sistemas aerobios. Así, Confer y Logan midieron la liberación de fragmentos provenientes de la degradación de albúmina bovina (1997a) y de dextrano (1997b) utilizando tanto cepas puras como provenientes de reactores industriales. Ellos determinaron que el tamaño molecular de la fracción remanente en solución disminuye conforme aumenta la diversidad de microorganismos presentes en el inóculo utilizado, de manera que la eficiencia de los procesos de tratamiento de aguas residuales industriales depende directamente de la diversidad de especies desarrollada. Haldane y Logan (1994), por su parte, cuantificaron la acumulación

de moléculas pequeñas (menor que 1 kDa) y de tamaño molecular intermedio (menor que 10 kDa) utilizando una cepa pura y dextrano como molécula modelo. (Morgenroth *et al.* (2002) presentaron una completa revisión del proceso y modelación de la hidrólisis de material particulado en sistemas de tratamiento aerobios.

1.2.6 Modelación del proceso de hidrólisis en sistemas anaerobios

Con el objetivo de diseñar y optimizar la operación de sistemas anaerobios tratando sustratos complejos se han planteado diversos modelos (ya sea empíricos o mecanísticos) que intentan representar los procesos descritos anteriormente.

La relación mas simple y comúnmente utilizada es la que considera una cinética de primer orden, establecida por Eastman y Ferguson (1981). En esta relación se asume que la velocidad de hidrólisis está linealmente relacionada (a pH y temperatura constantes) con la cantidad de sustrato biodegradable en el digestor. Sin embargo, este tipo de modelo no contribuye a la optimización del proceso de hidrólisis, por lo tanto se hace necesaria la introducción de modelos mecanísticos que permiten describir de manera más adecuada los procesos involucrados. Estos modelos se pueden clasificar en dos grupos: modelos de superficie y de crecimiento. El primero de ellos asume que la actividad enzimática está en exceso y que la velocidad de hidrólisis depende de la cantidad de superficie utilizable para las enzimas hidrolíticas (Hobson, 1987; Negri *et al.*, 1993; Vavilin *et al.*, 1996; Terashima y Lin, 2000; Sanders *et al.*, 2000; Vavilin *et al.*, 2004). En contraste con el modelo de superficie, los modelos de crecimiento asumen que hay una deficiencia en la actividad enzimática. De esta manera, en los modelos de crecimiento la velocidad de hidrólisis depende de la concentración y actividad de enzimas hidrolíticas o de biomasa hidrolítica (Chen y Hashimoto, 1980; Jain *et al.*, 1992; Negri *et al.*, 1993; Vavilin *et al.*, 1996; Goel *et al.*, 1998b; Batstone *et al.*, 2000).

En la mayoría de los casos, los modelos desarrollados no han considerado el tipo de enzimas hidrolíticas presentes, obviando las diferencias inherentes al contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas de los residuos estudiados, sin embargo algunos autores han tomado en cuenta este factor, intentado obtener un esquema

generalizado del proceso, posible de ajustar a cualquier tipo de residuo en cuestión. Así, el modelo presentado por Angelidaki *et al.* (1999) y más tarde el modelo ADM1 de la IWA (Batstone *et al.*, 2002), incluyen la presencia de carbohidratos, lípidos y proteínas, en su forma particulada y disuelta. Batstone *et al.* (2004), por su parte, consideran la tipología del agua residual para simular la estructura de los gránulos metanogénicos formados.

1.3 Reactores de membrana

Si bien es cierto, la aplicación exitosa del proceso de digestión anaerobia al tratamiento de aguas residuales depende fuertemente de la composición del residuo y las condiciones de operación (pH, temperatura, TRH, etc.), un factor que también debe ser considerado es la configuración de reactor utilizada (Speece *et al.*, 1997). Esto implica determinar, por ejemplo, el uso de una o dos fases; o la disposición de la biomasa, existiendo como alternativas los reactores de biofilm, granular o en suspensión; dicha elección puede resultar primordial ya que para el mismo desecho distintas configuraciones de reactor pueden arrojar distintos resultados (Zhang y Noike, 1991; Brindle y Stephenson, 1996; Bodik *et al.*, 2000; Kalyuzhnyi *et al.*, 2001; Azbar *et al.*, 2001), siendo algunas más eficientes que otras.

En términos generales, la capacidad de carga de un reactor anaerobio estará dada por tres factores: características del agua residual, cantidad y actividad de biomasa viable que el sistema puede retener y el grado de contacto entre la biomasa y el agua residual.

Las primeras aplicaciones prácticas del proceso anaerobio datan de finales del siglo XIX, y en general correspondían al tratamiento de residuos domiciliarios mediante tanques sépticos, tratamiento de lodos y residuos sólidos agrícolas y ganaderos (van Lier *et al.*, 2001).

En la década de los 50 se produjo el primer salto en el desarrollo tecnológico de los sistemas anaerobios al mejorar la eficiencia de los procesos por medio de la separación de los tiempos de residencia de sólidos (TRS) e hidráulico (TRH), llevado a cabo como una extensión del sistema de lodos activos para los sistemas biológicos aerobios. En la década del 70, en primer lugar con los filtros

anaerobios, y luego al principio de los 80 con la aparición de los reactores de lecho expandido, fluidizado, filtro descendente y posteriormente el reactor UASB en Holanda, los procesos anaerobios impactaron el área de la biotecnología ambiental. Aunque todos ellos permitieron desacoplar el TRH del TRS al mantener la biomasa inmovilizada dentro del reactor, lo que eliminó la necesidad de sedimentadores secundarios, las características de operación del reactor UASB determinaron el desarrollo de biomasa autoinmovilizada en forma de gránulos de alta actividad específica y excelente sedimentabilidad, mejorando a su vez el contacto entre la biomasa y el sustrato, aumentando en consecuencia su capacidad de tratamiento. En los años siguientes, sucesivas variantes de este sistema se han desarrollado en el mercado, como son los reactores de recirculación interna IC o los EGSB (McCarty, 2001), permitiendo aplicar los procesos anaerobios a una amplia variedad de aguas residuales. A los anteriores se han sumado la aparición de otras configuraciones como son los reactores de tipo secuencial (Dague *et al.*, 1992), de baffles (Skiadas y Lyberatos, 1998) o de lecho migrante (Angenent y Sung, 2001). En los últimos años se han destacado los sistemas de membranas, considerándose una alternativa interesante para el desarrollo futuro de la digestión anaerobia (Mulder *et al.*, 2001; van Lier *et al.*, 2001).

Los reactores de membrana fueron desarrollados en los años 70 para el tratamiento de aguas urbanas y consisten en la combinación de un reactor de biomasa suspendida con un sistema de separación por membranas, con el fin de obtener un efluente final clarificado de extraordinaria calidad, libre de sólidos suspendidos, virus y bacterias.

La combinación de la tecnología de separación por membranas con reactores biológicos ha dado un nuevo enfoque al tratamiento de aguas residuales, siendo una de las principales ventajas el poder contar con plantas de tratamientos más compactas, con elevados niveles de remoción de contaminantes. La aplicación de estos sistemas se ha dirigido, en la gran mayoría de los casos, al reemplazo de sistemas de sedimentación con el fin de independizar el tiempo de retención celular del TRH, pudiendo operar con concentraciones de biomasa muy elevadas, lo que resulta particularmente interesante en los reactores de lodos activos (Bailey *et al.*, 1994; Buisson *et al.*, 1998; Côte y Thompson, 2000; Ramphao *et al.*, 2005).

El mismo principio se ha aplicado a sistema anaerobios (Ross *et al.*, 1990; Fakhru'l-Razi, 1994; Elmaleh y Abdelmoumni, 1998; Lee *et al.*, 2001b; You *et al.*, 2005), debido a que si bien es cierto los reactores de última generación basan su desempeño en la operación con biomasa inmovilizada, como se detalló anteriormente, existen casos en los que no es posible contar con agregados bacterianos, ya sea porque las características del agua residual no lo permiten (alto contenido de sólidos suspendidos, agua residual de destilería de alcohol o agua doméstica, por ejemplo) o porque problemas operaciones provocan la desintegración de los gránulos o la flotación y lavado de la biomasa.

Los sistemas de separación permiten clasificar partículas por medio del uso de membranas semipermeables, de manera que cierto tipo de moléculas serán retenidas sobre la superficie de la membrana y otras lograrán pasar a través de ella, lo que en su conjunto determina la selectividad y productividad de una membrana. De acuerdo a la capacidad de separación, los sistemas de filtración por membranas se pueden clasificar en ultrafiltración y microfiltración y por otro lado en nanofiltración y osmosis inversa. Mientras que los primeros se aplican a partículas de mayor tamaño y la separación se realiza de acuerdo al tamaño de poro de la membrana, la nanofiltración y osmosis inversa están indicadas principalmente para compuestos de bajo peso molecular como azúcares, sales y iones, realizándose la clasificación mediante difusión. Para la remoción total de virus se requiere utilizar sistemas de ultrafiltración, en cambio la microfiltración elimina efectivamente las bacterias (Lenntech Water Treatment and Air Purification, 2005). En la Figura 1.2 se muestra descriptivamente la clasificación de los sistemas de separación por membranas de acuerdo al tamaño de partícula que es capaz de separar y la presión requerida para llevar a cabo el proceso.

A pesar de existir investigaciones con todas las técnicas descritas, debido a que el objetivo que se busca al acoplar sistemas de filtración a las plantas de tratamiento, generalmente es retener biomasa, patógenos y macromoléculas o sólidos en suspensión, los procesos más utilizados habitualmente son la ultrafiltración y microfiltración. Estos sistemas permiten separar moléculas disueltas por diferencias de tamaño, de manera que moléculas de tamaños superiores al tamaño de poro de la membrana serán retenidas sobre la superficie de la membrana. La

acumulación de las moléculas retenidas (adsorción de coloides, precipitación de materia inorgánica y adhesión de biomasa) forma progresivamente una capa concentrada, denominada capa gel, que puede alterar significativamente el comportamiento de la membrana. Este fenómeno se conoce como concentración de polarización. De esta manera, será de suma importancia conocer los efectos de la concentración de polarización y las condiciones de operación que minimicen este problema, con el fin de alcanzar el caudal y las propiedades óptimas de retención de la membrana. El efecto cuantitativo depende de la presión transmembrana, la velocidad del flujo cruzado (diferencia entre la presión de alimentación y la presión del retenido), de la viscosidad de la muestra y la concentración del soluto. Así, muchas de las investigaciones de los últimos años han apuntado a dar solución al problema derivado del continuo ensuciamiento de la membrana, lo que dificulta la operación estable del sistema de separación (Hogetsu *et al.*, 1992; Choo *et al.*, 2000; Sainbayar *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001a). Judd (2004) presentó una revisión acerca del fenómeno de ensuciamiento de la membrana y los factores que lo afectan.

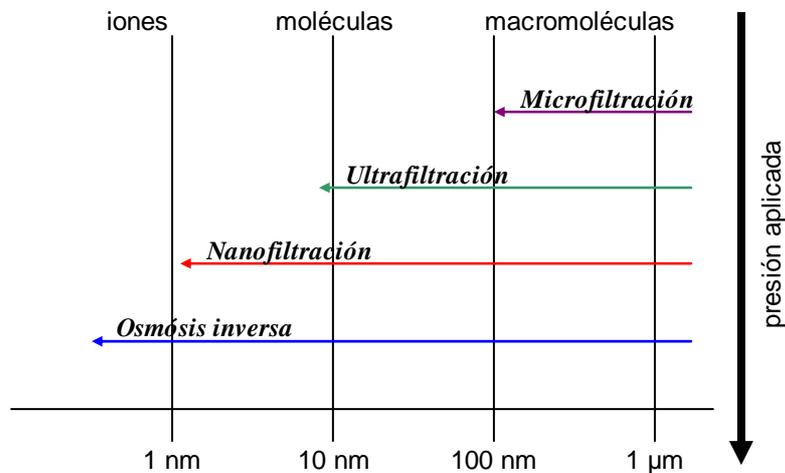


Figura 1.2. Clasificación de los sistemas de filtración por membranas.

Aunque, la principal aplicación de los reactores de membranas ha sido el permitir mantener elevadas concentraciones de biomasa en los reactores, lo que permite la completa mineralización de la materia orgánica del influente (vanDijk y Roncken,

1997), se han llevado a cabo estudios tendientes a la incorporación de dicha tecnología a otras áreas, como son la retención de compuestos de elevado peso molecular que pudieran requerir de una mayor tiempo de residencia dentro del sistema de tratamiento con el fin de mejorar su degradación. Winnen *et al.* (1996) investigaron la eficiencia de un reactor de membrana aerobio tratando un agua residual sintética que contenía caseína, almidón y glicerol. Un trabajo similar fue realizado por Cicek *et al.* (1998) utilizando caseína como molécula modelo y Knoblock *et al.* (1994) que llevan a cabo un estudio para el tratamiento aerobio de aguas residuales con alto contenido lipídico. En el caso de los procesos anaerobios, Harada *et al.* (1994) estudiaron la eficiencia de un sistema de membranas en la degradación de agua sintética que contenía una alta proporción de DQO particulado en forma de celulosa. El estudio se llevó a cabo en el rango mesófilo de temperatura y con una membrana de tamaño nominal de corte de 3 kDa.

Finalmente, se hace necesario resaltar que si bien es cierto la implementación de esta tecnología en los reactores biológicos para el tratamiento de aguas residuales conlleva importantes beneficios, dentro de las principales desventajas se encuentra el elevado requerimiento de energía que se requiere para mantener la velocidad de recirculación del flujo cruzado (primordial para extender la operación del sistema, minimizando los problemas de colmatación de la membrana) y para el mantenimiento de la permeabilidad de la membrana (Mulder *et al.*, 2001), lo que ha frenado su utilización a gran escala.

1.4 Referencias

- Agrawal,L.K., Ohashi,Y., Mochida,E., Okui,H., Ueki,Y., Harada,H. and Ohashi,A. (1997) Treatment of raw sewage in a temperate climate using a UASB reactor and the hanging sponge cubes process. *Water Science and Technology*, **36** (6-7), 433-440.
- Albers,S.V., Van de Vossenberg,J.L.C.M., Driessen,A.J.M. and Konings,W.N. (2001) Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*, **5** (5), 285-294.
- Angelidaki,I., Ellegaard,L. and Ahring,B.K. (1999) A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnology and Bioengineering*, **63** (3), 363-372.
- Angenent,L.T. and Sung,S. (2001) Development of anaerobic migrating blanket reactor (AMBR), a novel anaerobic treatment system. *Water Research*, **35** (7), 1739-1747.

- Azbar, N., Ursillo, P. and Speece, R.E. (2001) Effect of process configuration and substrate complexity on the performance of anaerobic processes. *Water Research*, **35** (3), 817-829.
- Bailey, A.D., Hansford, G.S. and Dold, P.L. (1994) The use of cross-flow microfiltration to enhance the performance of an activated-sludge reactor. *Water Research*, **28** (2), 297-301.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T., Siegrist, H. and Vavilin, V.A. (2002) The IWA anaerobic digestion model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology*, **45** (10), 65-73.
- 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.
- Batstone, D.J., Keller, J., Newell, R.B. and Newland, M. (2000) Modelling anaerobic degradation of complex wastewater. I: model development. *Bioresource Technology*, **75** (1), 67-74.
- Beccari, M., Majone, M., Papini, M.P. and Torrisi, L. (2001) Enhancement of anaerobic treatability of olive oil mill effluents by addition of Ca(OH)₂ and bentonite without intermediate solid/liquid separation. *Water Science and Technology*, **43** (11), 275-282.
- Bodik, I., Herdova, B. and Drtil, M. (2000) Anaerobic treatment of the municipal wastewater under psychrophilic conditions. *Bioprocess Engineering*, **22** (5), 385-390.
- Breure, A.M., Mooijman, K.A. and van Andel, J.G. (1986) Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **24**, 426-431.
- Brindle, K. and Stephenson, T. (1996) The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, **49** (6), 601-610.
- Buisson, H., Cote, P., Praderie, M. and Paillard, H. (1998) The use of immersed membranes for upgrading wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, **37** (9), 89-95.
- Chen, Y.R. and Hashimoto, A.G. (1980) Substrate utilization kinetic model for biological treatment processes. *Biotechnology and Bioengineering*, **22**, 2081-2095.
- Choo, K.H., Kang, I.J., Yoon, S.H., Park, H., Kim, J.H., Adiya, S. and Lee, C.H. (2000) Approaches to membrane fouling control in anaerobic membrane bioreactors. *Water Science and Technology*, **41** (10-11), 363-371.
- Chyi, Y.T. and Dague, R.R. (1994) Effects of particulate size in anaerobic acidogenesis using cellulose as a sole carbon source. *Water Environment Research*, **66** (5), 670-678.
- Chyi, Y.T. and Levine, A.D. (1992) Solubilization of particulate cellulose using anaerobic acidogenesis. *Water Science and Technology*, **26** (9-11), 2421-2424.

- Cicek,N., Winnen,H., Suidan,M.T., Wrenn,B.E., Urbain,V. and Manem,J. (1998) Effectiveness of the membrane bioreactor in the biodegradation of high molecular weight compounds. *Water Research*, **32** (5), 1553-1563.
- Confer,D.R. and Logan,B.E. (1997a) Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures .1. Bovine serum albumin. *Water Research*, **31** (9), 2127-2136.
- Confer,D.R. and Logan,B.E. (1997b) Molecular weight distribution of hydrolysis products during the biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures .2. Dextran and dextrin. *Water Research*, **31** (9), 2137-2145.
- Côte,P. and Thompson,D. (2000) Wastewater treatment using membranes: the North American experience. *Water Science and Technology*, **41** (10-11), 209-215.
- Dague,R.R., Habben,C.E. and Pidaparti,S.R. (1992) Initial studies on the anaerobic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, **26** (9-11), 2429-2432.
- Demirel,B. and Yenigun,O. (2002) Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **77** (7), 743-755.
- Eastman,J.A. and Ferguson,J.F. (1981) Solubilization of particulate organic-carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *Journal Water Pollution Control Federation*, **53** (3), 352-366.
- Elmaleh,S. and Abdelmoumi,L. (1998) Experimental test to evaluate performance of an anaerobic reactor provided with an external membrane unit. *Water Science and Technology*, **38** (8-9), 385-392.
- Fakhru'l-Razi,A. (1994) Ultrafiltration membrane separation for anaerobic wastewater treatment. *Water Science and Technology*, **30** (12), 321-327.
- Fang,H.H.P. and Yu,H.Q. (2002) Mesophilic acidification of gelatinaceous wastewater. *Journal of Biotechnology*, **93** (2), 99-108.
- Field,J.A. (2002) Limits of anaerobic biodegradation. *Water Science and Technology*, **45** (10), 9-18.
- Fujishima,S., Miyahara,T. and Noike,T. (2000) Effect of moisture content on anaerobic digestion of dewatered sludge: ammonia inhibition to carbohydrate removal and methane production. *Water Science and Technology*, **41** (3), 119-127.
- Galbraith,H. and Miller,T.B. (1973) Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts. *Journal of Applied Bacteriology*, **36** (4), 647-658.
- Gavala,H.N. and Lyberatos,G. (2001) Influence of anaerobic culture acclimation on the degradation kinetics of various substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, **74** (3), 181-195.
- Gerday,C., Aittaleb,M., Bentahir,M., Chessa,J.P., Claverie,P., Collins,T., D'Amico,S., Dumont,J., Garsoux,G., Georgette,D., Hoyoux,A., Lonhienne,T., Meuwis,M.A. and Feller,G. (2000) Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **18** (3), 103-107.

- Ginestet,P., Maisonnier,A. and Sperandio,M. (2002) Wastewater COD characterization: biodegradability of physico-chemical fractions. *Water Science and Technology*, **45** (6), 89-97.
- Glenn,A.R. (1976) Production of extracellular proteins by bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **30**, 41-62.
- Goel,R., Mino,T., Satoh,H. and Matsuo,T. (1997) Effect of electron acceptor conditions on hydrolytic enzyme synthesis in bacterial cultures. *Water Research*, **31** (10), 2597-2603.
- Goel,R., Mino,T., Satoh,H. and Matsuo,T. (1998a) Comparison of hydrolytic enzyme systems in pure culture and activated sludge under different electron acceptor conditions. *Water Science and Technology*, **37** (4-5), 335-343.
- Goel,R., Mino,T., Satoh,H. and Matsuo,T. (1998b) Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions inactivated sludge sequencing batch reactor. *Water Research*, **32** (7), 2081-2088.
- Gounot,A.M. (1986) Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia*, **42** (11-12), 1192-1197.
- Haldane,G.M. and Logan,B.E. (1994) Molecular size distributions of a macromolecular polysaccharide (dextran) during its biodegradation in batch and continuous cultures. *Water Research*, **28** (9), 1873-1878.
- Harada,H., Momonoi,K., Yamazaki,S. and Takizawa,S. (1994) Application of anaerobic-UF membrane reactor for treatment of a wastewater containing high-strength particulate organics. *Water Science and Technology*, **30** (12), 307-319.
- Hobson,P.N. (1987) A model of some aspects of microbial degradation of particulate substrate. *Journal of fermentation Technology*, **65**, 431-439.
- Hogetsu,A., Ishikawa,T., Yoshikawa,M., Tanabe,T., Yodate,S. and Sawada,J. (1992) High-rate anaerobic digestion of wool scouring wastewater in a digester combined with membrane-filter. *Water Science and Technology*, **25** (7), 341-350.
- Jain,S., Lala,A.K., Bhatia,S.K. and Kudchadker,A.P. (1992) Modeling of hydrolysis controlled anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **53** (4), 337-344.
- Judd,S. (2004) A review of fouling of membrane bioreactors in sewage treatment. *Water Science and Technology*, **49** (2), 229-235.
- Kalyuzhnyi,S., Veeken,A. and Hamelers,B. (2000) Two-particle model of anaerobic solid state fermentation. *Water Science and Technology*, **41** (3), 43-50.
- Kalyuzhnyi,S.V., Gladchenko,M.A., Sklyar,V.I., Kizimenko,Y.S. and Shcherbakov,S.S. (2001) Psychrophilic one- and two-step systems for pretreatment of winery waste water. *Water Science and Technology*, **44** (4), 23-31.
- Kanwar,S.S. and Guleri,R.L. (1994) Performance evaluation of a family-size, rubber-balloon biogas plant under hilly conditions. *Bioresource Technology*, **50** (2), 119-121.

- Kashyap,D.R., Dadhich,K.S. and Sharma,S.K. (2003) Biomethanation under psychrophilic conditions: a review. *Bioresource Technology*, **87**, 147-153.
- Knoblock,M.D., Sutton,P.M., Mishra,P.N., Gupta,K. and Janson,A. (1994) Membrane biological reactor system for treatment of oily wastewaters. *Water Environment Research*, **66** (2), 133-139.
- Komatsu,T., Hanaki,K. and Matsuo,T. (1991) Prevention of lipid inhibition in anaerobic processes by introducing a two-phase system. *Water Science and Technology*, **23** (7-9), 1189-1200.
- Konings,W.N., Albers,S.V., Koning,S. and Driessen,A.J.M. (2002) The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **81** (1-4), 61-72.
- Lalman,J. and Bagley,D.M. (2002) Effects of C18 long chain fatty acids on glucose, butyrate and hydrogen degradation. *Water Research*, **36** (13), 3307-3313.
- Lee,H., Amy,G., Cho,J.W., Yoon,Y.M., Moon,S.H. and Kim,I.S. (2001a) Cleaning strategies for flux recovery of an ultrafiltration membrane fouled by natural organic matter. *Water Research*, **35** (14), 3301-3308.
- Lee,S.M., Jung,J.Y. and Chung,Y.C. (2001b) Novel method for enhancing permeate flux of submerged membrane system in two-phase anaerobic reactor. *Water Research*, **35** (2), 471-477.
- Lenntech Water Treatment and Air Purification. 2005. *Membrane Technology*. Disponible desde Internet en: <http://www.lenntech.com/membrane-technology.htm>. Con acceso el 30-8-2005.
- Lettinga,G., Rebac,S. and Zeeman,G. (2001) Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, **19** (9), 363-370.
- Levine,A.D., Tchobanoglous,G. and Asano,T. (1985) Characterization of the size distribution of contaminants in wastewater: treatment and reuse implications. *Journal Water Pollution Control Federation*, **57** (7), 805-816.
- Li,Z.K. and Wrenn,B.A. (2004) Effects of ferric hydroxide on the anaerobic biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil in freshwater sediments. *Water Research*, **38** (18), 3859-3868.
- Lokshina,L.Y., Vavilin,V.A., Salminen,E. and Rintala,J. (2003) Modeling of anaerobic degradation of solid slaughterhouse waste - Inhibition effects of long-chain fatty acids or ammonia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **109** (1-3), 15-32.
- Maharaj,I. and Elefsiniotis,P. (2001) The role of HRT and low temperature on the acid-phase anaerobic digestion of municipal and industrial wastewaters. *Bioresource Technology*, **76** (3), 191-197.
- Mahmoud,N., Zeeman,G., Gijzen,H. and Lettinga,G. (2003) Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. *Bioresource Technology*, **90** (1), 1-9.

- Mahmoud,N., Zeeman,G., Gijzen,H. and Lettinga,G. (2004) Anaerobic sewage treatment in a one-stage UASB reactor and a combined UASB-Digester system. *Water Research*, **38** (9), 2348-2358.
- Marani,D., Renzi,V., Ramadori,R. and Braguglia,C.M. (2004) Size fractionation of COD in urban wastewater from a combined sewer system. *Water Science and Technology*, **50** (12), 79-86.
- Martin,S.A. (1994) Nutrient transport by ruminal bacteria - a review. *Journal of Animal Science*, **72** (11), 3019-3031.
- McCarty,P.L. (2001) The development of anaerobic treatment and its future. *Water Science and Technology*, **44** (8), 149-156.
- McInerney,M.J. (1988) *Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins*. In: *Biology of Anaerobic Microorganism*. Zehnder,A.J. (ed), pp. 373-415, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Miron,Y., Zeeman,G., Van Lier,J.B. and Lettinga,G. (2000) The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Research*, **34** (5), 1705-1713.
- Morgenroth,E., Kommedal,R. and Harremoes,P. (2002) Processes and modeling of hydrolysis of particulate organic matter in aerobic wastewater treatment - a review. *Water Science and Technology*, **45** (6), 25-40.
- Mulder,R., Vereijken,T.L.F.M., Frijters,C.T.M.J. and Vellinga,S.H.J. (2001) Future perspectives in bioreactor development. *Water Science and Technology*, **44** (8), 27-32.
- Nakhla,G., Al Sabawi,M., Bassi,A. and Liu,V. (2003) Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, **102** (2-3), 243-255.
- Nedwell,D.B. (1999) Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *Fems Microbiology Ecology*, **30** (2), 101-111.
- Negri,E.D., Mataalvarez,J., Sans,C. and Cecchi,F. (1993) A mathematical-model of volatile fatty-acids (VFA) production in a plug-flow reactor treating the organic fraction of municipal solid-waste (MSW). *Water Science and Technology*, **27** (2), 201-208.
- Nisman,B. (1954) The Stickland Reaction. *Bacteriological Reviews*, **18** (1), 16-42.
- Novak,J.T. and Carlson,D.A. (1970) Kinetics of anaerobic long chain fatty acid degradation. *Journal Water Pollution Control Federation*, **42** (11), 1932-&.
- Nybroe,O., Jorgensen,P.E. and Henze,M. (1992) Enzyme activities in wastewater and activated sludge. *Water Research*, **26** (5), 579-584.
- Pavlostathis,S.G. and Giraldo Gomez,E. (1991) Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science and Technology*, **24** (8), 35-59.

- Perot,C., Sergent,M., Richard,P., Phan,T.L.R. and Millot,N. (1988) The effects of pH, temperature and agitation speed on sludge anaerobic hydrolysis-acidification. *Environmental Technology Letters*, **9** (8), 741-752.
- Philip,H., Maunoir,S., Rambaud,A. and Philippi,L.S. (1993) Septic-tank sludges - accumulation rate and biochemical characteristics. *Water Science and Technology*, **28** (10), 57-64.
- Quesada-Perez,M., Gonzalez-Tovar,E., Martin-Molina,A., Lozada-Cassou,M. and Hidalgo-Alvarez,R. (2003) Overcharging in colloids: Beyond the Poisson-Boltzmann approach. *Chemphyschem*, **4** (3), 235-248.
- Ramphao,M., Wentzel,M.C., Merritt,R., Ekama,G.A., Young,T. and Buckley,C.A. (2005) Impact of membrane solid-liquid separation on design of biological nutrient removal activated sludge systems. *Biotechnology and Bioengineering*, **89** (6), 630-646.
- Ramsay,I.R. and Pullammanappallil,P.C. (2001) Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, **12** (4), 247-257.
- Rinzema,A., Boone,M., Vanknippenberg,K. and Lettinga,G. (1994) Bactericidal effect of long-chain fatty-acids in anaerobic-digestion. *Water Environment Research*, **66** (1), 40-49.
- Ross,W.R., Barnard,J.P., Leroux,J. and Devilliers,H.A. (1990) Application of ultrafiltration membranes for solids - liquid separation in anaerobic-digestion systems - the ADUF process. *Water Sa*, **16** (2), 85-91.
- Sainbayar,A., Kim,J.S., Jung,W.J., Lee,Y.S. and Lee,C.H. (2001) Application of surface modified polypropylene membranes to an anaerobic membrane bioreactor. *Environmental Technology*, **22** (9), 1035-1042.
- Sanders,W.T.M., Geerink,M., Zeeman,G. and Lettinga,G. (2000) Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates. *Water Science and Technology*, **41** (3), 17-24.
- Sharma,R., Chisti,Y. and Banerjee,U.C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, **19** (8), 627-662.
- Siegrist,H., Renggli,D. and Gujer,W. (1993) Mathematical-modeling of anaerobic mesophilic sewage-sludge treatment. *Water Science and Technology*, **27** (2), 25-36.
- Singh,K.S. and Viraraghavan,T. (2003) Impact of temperature on performance, microbiological, and hydrodynamic aspects of UASB reactors treating municipal wastewater. *Water Science and Technology*, **48** (6), 211-217.
- Skiadas,I.V. and Lyberatos,G. (1998) The periodic anaerobic baffled reactor. *Water Science and Technology*, **38** (8-9), 401-408.
- Sophonsiri,C. and Morgenroth,E. (2004) Chemical composition associated with different particle size fractions in municipal, industrial, and agricultural wastewaters. *Chemosphere*, **55** (5), 691-703.
- Speece,R.E., Duran,M., Demirer,G., Zhang,H. and DiStefano,T. (1997) The role of process configuration in the performance of anaerobic systems. *Water Science and Technology*, **36** (6-7), 539-547.

- Sutter, K. and Wellinger, A. (1985) Methane production from cow manure at low-temperatures. *Experientia*, **41** (4), 554.
- Terashima, Y. and Lin, S. (2000) On the modeling of microbiological hydrolysis of organic solids. *Water Science and Technology*, **42** (12), 11-19.
- Valentini, A., Garuti, G., Rozzi, A. and Tilche, A. (1997) Anaerobic degradation kinetics of particulate organic matter: A new approach. *Water Science and Technology*, **36** (6-7), 239-246.
- Valles, S., Flors, A., Lequerica, J.L. and Madarro, A. (1980) Production of methane by anaerobic fermentation .1. Description of the process. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, **20** (2), 189-208.
- van Lier, J.B., Tilche, A., Ahring, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Pol, L.W.H., Lens, P. and Verstraete, W. (2001) New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, **43** (1), 1-18.
- vanDijk, L. and Roncken, G.C.G. (1997) Membrane bioreactors for wastewater treatment: The state of the art and new developments. *Water Science and Technology*, **35** (10), 35-41.
- Vavilin, V.A., Lokshina, L.Y., Jokela, J.P.Y. and Rintala, J.A. (2004) Modeling solid waste decomposition. *Bioresource Technology*, **94** (1), 69-81.
- Vavilin, V.A., Rytov, S.V. and Lokshina, L.Y. (1996) A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology*, **56** (2-3), 229-237.
- Veeken, A. and Hamelers, B. (1999) Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource Technology*, **69** (3), 249-254.
- Warren, R.A.J. (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, **50**, 183-212.
- Winnen, H., Suidan, M.T., Scarpino, P.V., Wrenn, B., Cicek, N., Urbain, V. and Manem, J. (1996) Effectiveness of the membrane bioreactor in the biodegradation of high molecular-weight compounds. *Water Science and Technology*, **34** (9), 197-203.
- You, H.S., Tseng, C.C., Peng, M.J., Chang, S.H., Chen, Y.C. and Peng, S.H. (2005) A novel application of an anaerobic membrane process in wastewater treatment. *Water Science and Technology*, **51** (6-7), 45-50.
- Yu, H.Q. and Fang, H.H.P. (2003) Acidogenesis of gelatin-rich wastewater in an upflow anaerobic reactor: influence of pH and temperature. *Water Research*, **37** (1), 55-66.
- Zhang, T.C. and Noike, T. (1991) Comparison of one-phase and two-phase anaerobic-digestion processes in characteristics of substrate degradation and bacterial population-levels. *Water Science and Technology*, **23** (7-9), 1157-1166.

CAPÍTULO SEGUNDO

Metodología analítica, materiales y equipos

RESUMEN

Este capítulo tiene por objetivo describir detalladamente tanto la metodología analítica empleada durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, como la metodología experimental y características del agua sintética utilizada en los diversos experimentos.

INDICE

2.1	CARACTERÍSTICAS DEL AGUA SINTÉTICA	2-3
2.2	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	2-4
2.2.1	<i>Actividad hidrolítica</i>	2-4
2.2.2	<i>Actividad acidogénica</i>	2-5
2.2.3	<i>Actividad metanogénica</i>	2-6
2.2.4	<i>Fraccionamiento molecular</i>	2-7
2.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	2-10
2.3.1	<i>Fase líquida</i>	2-10
2.3.2	<i>Fase sólida</i>	2-18
2.4	REFERENCIAS	2-19

2.1 Características del agua sintética

Para la realización de los estudios en continuo se utilizó un agua residual sintética con las características descritas en la Tabla 2.1. La fuente de carbono está dada, por almidón soluble de patata (CAS 9005-84-9), de peso molecular 160 kDa, de la casa comercial Panreac (ref. 121096) para los experimentos descritos en los Capítulos 3, 4 y 5, y por gelatina 80-100 blooms (CAS 9000-70-8), de peso molecular entre 20 y 30 kDa, de la misma casa comercial (ref. 142060), para los experimentos presentados en el Capítulo 6.

Tabla 2.1. Composición del agua residual sintética

	Almidón soluble	Gelatina 80-100 blooms
Fuente de carbono	1,5 g/L	3 g/L
Bicarbonato de Sodio		1,5 g/L
Cloruro de Calcio anhidro ¹		0,1 g/L
Solución de macronutrientes	0,163 mL/g sustrato	
Solución de micronutrientes	0,163 mL/g sustrato	

(1) para los experimentos que correspondan.

La composición de la solución de macronutrientes se describe en la Tabla 2.2 y la de micronutrientes se presenta en la Tabla 2.3.

Tabla 2.2. Composición de la solución de macronutrientes utilizada en la formulación del agua residual sintética.

	g/L
NH ₄ Cl ¹	170
KH ₂ PO ₄	37
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8
MgSO ₄ ·4H ₂ O	9

(1) para los experimentos con gelatina no se incluyó NH₄Cl.

Tabla 2.3. Composición de la solución de micronutrientes utilizada en la formulación del agua residual sintética.

	mg/L
FeCl ₃ ·4H ₂ O	2.000
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.000
MnCl ₂ ·4H ₂ O	500
CuCl ₂ ·2H ₂ O	30
ZnCl ₂	50
H ₃ BO ₃	50
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	90
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	100
NiCl ₂ ·6H ₂ O	50
EDTA	1.000
HCl 36%	1

2.2 Procedimientos experimentales

2.2.1 Actividad hidrolítica

La etapa de hidrólisis puede ser la limitante para el caso de la degradación anaerobia de sustratos complejos, por lo que es importante realizar el ensayo de actividad hidrolítica de un lodo anaerobio para un sustrato específico. En este caso se utilizó almidón soluble de la casa comercial Panreac (ref. 121096). Los ensayos se llevaron a cabo en botellas de 125 mL con 100 mL de volumen útil. El protocolo es el siguiente (Soto *et al.*, 1993):

- Adición de bicarbonato de sodio (para obtener una concentración final de 1,5 g NaHCO₃/L);
- Adición de un volumen determinado de lodo para conseguir una concentración en la botella de 1 - 2 gSSV/L;
- Adición de un volumen determinado de agua;
- Ajuste del pH entre 7,0-7,1, usando soluciones 1N o 5N de HCl o NaOH;
- Sellado de las botellas;

- Incubación en un baño a la temperatura seleccionada por aproximadamente 30 minutos;
- Adición del sustrato (en este caso almidón soluble) para obtener una concentración final de 1,5 g/L;
- Homogeneización mediante agitación suave e incubación a la temperatura seleccionada.

El seguimiento del ensayo se lleva a cabo mediante la determinación periódica del almidón remanente en las botellas, extrayendo cada vez un volumen de 1,5 mL del sobrenadante. La periodicidad del muestreo depende de la temperatura de incubación seleccionada, siendo de 1 vez al día para 15°C y de cada 2 a 3 horas para 37°C. La concentración de almidón se obtiene de la diferencia entre la determinación de azúcares totales (2.3.1.a) y la determinación de azúcares reductores (2.3.1.b). El valor de la actividad hidrolítica ($\text{g}_{\text{almidón degradado}}/\text{g}_{\text{SSV}}\cdot\text{d}$) se obtiene del cociente entre la pendiente máxima de desaparición de almidón y el valor de biomasa (SSV) empleada en el ensayo, determinada según el método descrito en el punto 2.3.2.a.

2.2.2 Actividad acidogénica

El test de actividad acidogénica se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el punto anterior, para la determinación de la actividad hidrolítica, siendo utilizado glucosa como sustrato (Soto *et al.*, 1993). El seguimiento del ensayo se realiza mediante la determinación periódica de la glucosa remanente en las botellas por medio del ensayo DNS (2.3.1.b) para la cuantificación de azúcares reductores. La periodicidad del muestro es igual a la descrita para el ensayo de actividad hidrolítica, siendo necesario un volumen de muestra de 1 mL de sobrenadante. El valor de la actividad acidogénica ($\text{g}_{\text{glucosa degradada}}/\text{g}_{\text{SSV}}\cdot\text{d}$) se obtiene del cociente entre la pendiente máxima de desaparición de glucosa y el valor de biomasa (SSV) empleada en el ensayo, determinada según el método descrito en el punto 2.3.2.a.

2.2.3 Actividad metanogénica

Los ensayos de actividad metanogénica se llevan a cabo empleando las mismas botellas ya descritas. El procedimiento es el siguiente (Soto *et al.*, 1993):

- Adición dentro de las botellas de un volumen de agua previamente calculado;
- Adición de solución reductora (para obtener una concentración final de 100 mg $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}/\text{L}$) y de bicarbonato de sodio (para obtener una concentración final de 1,5 g NaHCO_3/L);
- Adición de un volumen determinado de lodo para conseguir una concentración en la botella de entre 1 y 2,5 gSSV/L;
- Ajuste del pH entre 7,0-7,1, usando soluciones 1N o 5N de HCl o NaOH;
- Borboteo de una mezcla de gas N_2/CO_2 85/15%;
- Sellado de las botellas y conexión al sistema de medida de metano;
- Incubación a la temperatura seleccionada por un tiempo aproximado de 30 minutos;
- Adición de los sustratos y homogeneización mediante agitación suave;
- Incubación a la temperatura seleccionada.

Como sustrato para estos ensayos se emplea una solución de AGV previamente neutralizada con NaOH. Las concentraciones dentro de cada botella deben ser de 1,0 g ácido acético/L; 0,5 g ácido propiónico/L y 0,5 g ácido n-butírico/L.

Durante el ensayo se sigue la producción de metano con un frasco Mariotte invertido conectado a la botella, que contiene una solución de NaOH al 2,5%. Para determinar la actividad metanogénica se mide la pendiente máxima de la producción de metano. Para calcular la actividad metanogénica específica (AME) se determinan los sólidos suspendidos volátiles de cada botella (2.3.2.a) y se divide el valor obtenido a partir de la velocidad de producción de metano por la concentración de SSV empleada.

En la Figura 2.1 se muestra un esquema del montaje experimental.

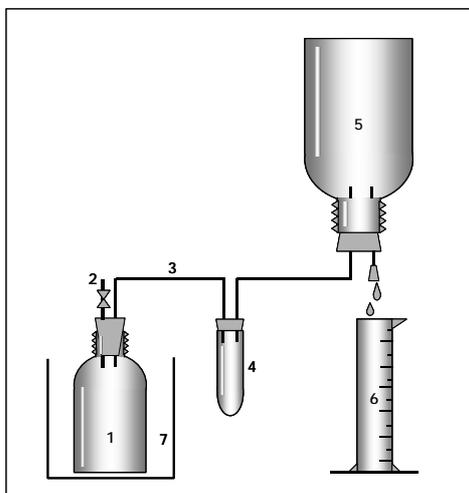


Figura 2.1. Montaje experimental de los ensayos de actividad metanogénica. 1. Vial; 2. Punto de muestreo; 3. Conducción de gas; 4. Tubo de seguridad; 5. Frasco Mariotte; 6. Probeta; 7. Baño termostático.

2.2.4 Fraccionamiento molecular

Con el fin de determinar los tamaños relativos de las fracciones tanto de almidón como de gelatina, hidrolizados durante el proceso de digestión anaerobia, se utilizó un método basado en el fraccionamiento por tamaño molecular utilizando una célula de agitación AMICON (casa comercial Millipore). Las características de las membranas utilizadas se presentan en la Tabla 2.4. En la Figura 2.2 se muestra el equipo utilizado y en la Tabla 2.5 sus principales características.

Tabla 2.4. Características de las membranas de ultrafiltración utilizadas en la célula de agitación AMICON.

Tamaño de poro (kDa)	1, 10 y 100 ¹
Material	Celulosa regenerada (serie Ym)
Diámetro (mm)	25
Presión de operación máx (atm)	4,7 atm (0,7 atm: membrana 100 kDa)
Temperatura de operación máx (°C)	121

(1) este tamaño solo se utilizó para los experimentos que consideraron almidón soluble como sustrato.



Figura 2.2. Célula de agitación AMICON.

Tabla 2.5. Características de la célula de agitación AMICON para ultrafiltración.

Modelo	8010
Volumen máximo procesable (mL)	10
Volumen mínimo procesable (mL)	1
Diámetro de membrana (mm)	25
Area de membrana efectiva (cm ²)	4,1
Volumen retenido en la membrana (mL)	0,2
Altura (cm)	7,7
Base (cm)	6 x 6
Peso (kg)	0,1

El método de fraccionamiento se basa en la realización de un balance de masa, según el procedimiento descrito en la Figura 2.3. De esta manera, y determinando para cada fracción el volumen recogido y su DQO (2.3.1.g), es posible obtener la información relativa al grado de hidrólisis de las moléculas presentes en la muestra.

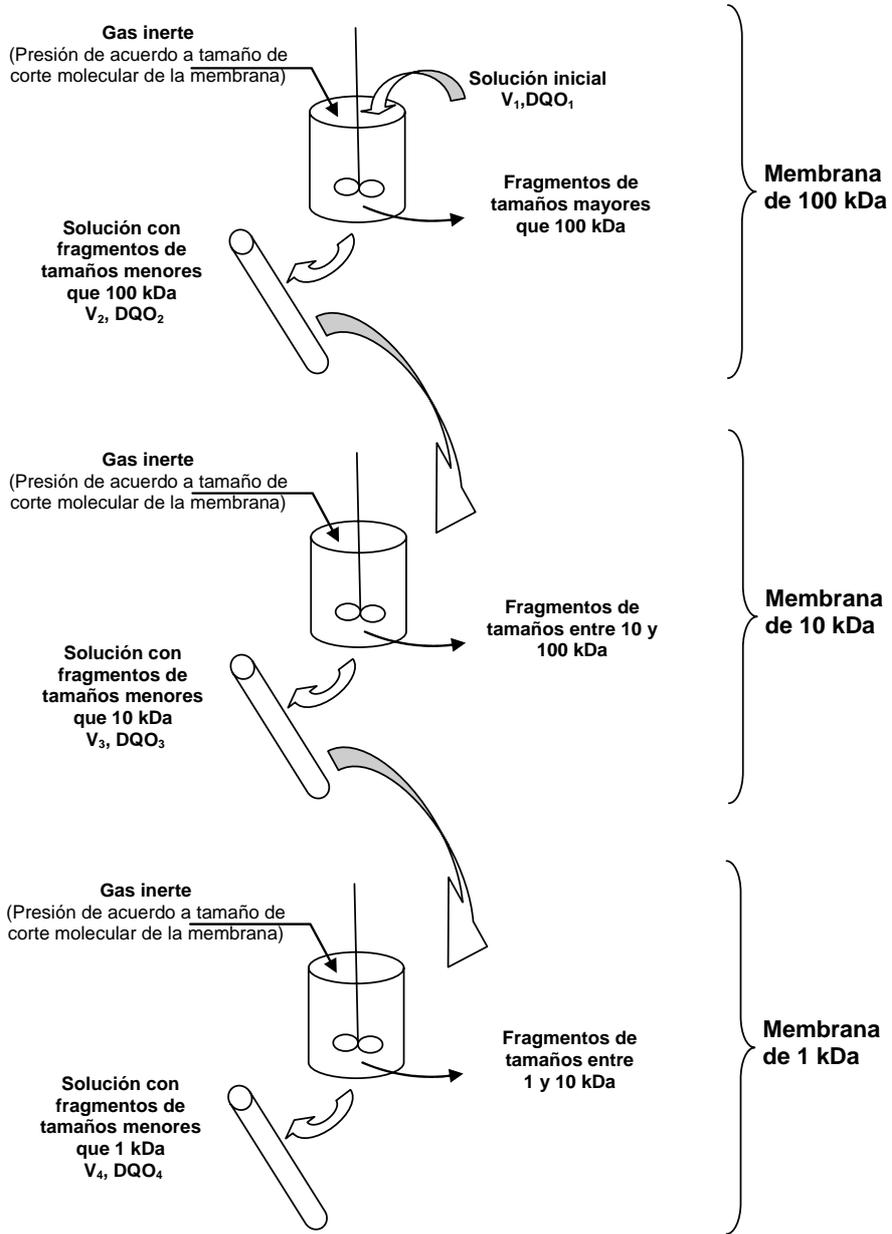


Figura 2.3. Procedimiento para el fraccionamiento por tamaño molecular utilizando una célula de agitación AMICON.

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Fase líquida

2.3.1.a Azúcares totales

El método basado en el desarrollado por Dubois y colaboradores (1956) permite la determinación de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados que tengan azúcares reductores libres o potencialmente libres, dando un color amarillo-naranja, detectable a 490 nm, cuando están en presencia de fenol y ácido sulfúrico.

Los reactivos utilizados son: solución de fenol al 5% y solución de sulfato de hidracina (5 gramos de sulfato de hidracina en 1 L de ácido sulfúrico concentrado). El procedimiento es el siguiente:

- Colocar 1 mL de muestra (tomando en consideración el rango lineal del método) en un tubo de vidrio Pyrex de pared gruesa
- Añadir 1 mL de solución de fenol
- Añadir rápidamente 5 mL de sulfato de hidracina, y mezclar en un vortex.
- Incubar en la oscuridad por 45 minutos
- Medir en espectrofotómetro a 490 nm, utilizando cubetas de plástico, frente a un blanco en el que se ha reemplazado la muestra por agua destilada.
- Construir una recta de calibrado, entre 0 y 100 mg/L, utilizando una solución de 2 g/L de glucosa como estándar.

La concentración de azúcares totales de la muestra se determina a partir de la ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración del patrón, obtenida de la recta de calibrado, considerando el factor de dilución correspondiente.

2.3.1.b Azúcares reductores

Se utilizó el método modificado del DNS (Miller, 1959) que se basa en la digestión ácida con un reactivo mezcla (composición 10,6 g de ácido

dinitrosalicílico; 19,6 g de hidróxido de sodio; 306 g de tartrato sódico y potásico; 7,6 mL de fenol; 8,3 g de metabisulfito sódico; y 1416 mL de agua destilada). El procedimiento es el siguiente:

- Añadir 1 mL de la muestra en un tubo de ensayo con tapa rosca, considerando la dilución requerida según la recta de calibrado;
- Agregar 3 mL de solución de DNS y cerrar los tubos;
- Mezclar en vortex;
- Incubar en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, exactamente;
- Enfriar a temperatura ambiente;
- Medir en espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm, contra un blanco en que se reemplazó la muestra por agua destilada.
- Construir una recta de calibrado, siguiendo el procedimiento anterior, entre 0 y 1 g/L utilizando una solución de 2 g/L de glucosa como patrón.

La concentración de azúcares reductores de la muestra se determina a partir de la ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración del patrón, obtenida de la recta de calibrado, considerando el factor de dilución correspondiente.

2.3.1.c Proteína total y soluble: Método de Lowry

La determinación de proteínas se realiza por medio del método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951), modificado por Peterson (1977) y desarrollado por Sigma (Procedimiento P-5656).

El método se basa en que ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano, y cisteína reaccionan en un medio alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molíbdico del reactivo de Folin para dar un complejo incoloro que puede ser reducido en una reacción lenta por fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría entre 600 y 900 nm (con una absorbancia máxima de 740 nm). Esta coloración es reforzada por la complejación de sulfato de cobre con los enlaces peptídicos de las proteínas. La intensidad de la coloración obtenida depende del número y de la naturaleza de los residuos que constituyen la proteína presente en la muestra a analizar.

Previa a la medida de las muestras se realiza una recta de calibrado entre 0 – 400 mg/L utilizando como patrón albúmina bovina (Sigma, ref. P-7656).

Los reactivos son: reactivo de Lowry modificado (sulfato cúprico pentahidratado; tartrato de potasio; carbonato de sodio; sodio dodecil sulfato (SDS); y reactivo de Folin & Ciocalteu de fenol (ácido fosfotungsténico; ácido molíbdico y fenol). Los reactivos se preparan de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. El procedimiento es el siguiente:

- Transferir 1 mL de muestra a un tubo de ensayo de 10 mL, considerando la dilución correspondiente para el rango de linealidad de la recta de calibración;
- Agregar 1 mL de reactivo de Lowry. Homogeneizar durante 5 segundos en el vortex y esperar a temperatura ambiente durante 20 minutos;
- Homogeneizar nuevamente y al mismo tiempo agregar 0,5 mL de reactivo de Folin & Ciocalteu de fenol y esperar a temperatura ambiente durante 30 minutos;
- Leer en espectrofotómetro a 740 nm, utilizando cubetas plásticas, midiendo contra un blanco preparado reemplazando la muestra por agua destilada.

La concentración de proteína se obtiene de:

$$proteína \ [mg / L] = A \cdot e^{abs} + B$$

en donde A es la pendiente obtenida en la recta de calibrado y B es la ordenada en el origen. Abs corresponde a la medida de absorbancia para la muestra.

2.3.1.d Gelatina: método de Biuret

La determinación de gelatina se lleva a cabo por el método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949), modificado por Watters (1978) y desarrollado por Fluka (reactivo Biuret N° 15280). Se seleccionó este método debido a que no depende de la composición aminoacídica de la proteína a diferencia de los métodos comúnmente utilizados (Lowry y Bradford). Sin embargo, tiene la desventaja de

ser poco sensible, ya que es incapaz de detectar concentraciones inferiores a 0,5 g/L de proteína.

El método se fundamenta en la formación de un complejo coordinado entre los iones cúpricos del reactivo y el enlace peptídico de la proteína, reacción que transcurre en medio alcalino. Este complejo de color azul puede ser medido a 546 nm, siendo su intensidad proporcional a la concentración de proteína. Se requiere que el péptido tenga al menos cuatro enlaces peptídicos para que el reactivo de Biuret pueda actuar.

La recta de calibrado se lleva a cabo con albúmina de suero bovino (BSA) en el rango de 0,5 – 5 g/L.

El reactivo de Biuret está compuesto por: sulfato de cobre (+2) pentahidratado, tartrato de sodio potasio tetrahidratado, yoduro de potasio, carbonato de sodio e hidróxido de sodio. El procedimiento es el siguiente:

- Transferir 0,5 mL de muestra centrifugada a un tubo de ensayo de 10 mL, considerando la dilución correspondiente para el rango de linealidad de la recta de calibración;
- Agregar 2,5 mL de reactivo de Biuret. Homogeneizar durante 5 segundos en el vortex y esperar a temperatura ambiente durante 30 minutos;
- Leer en espectrofotómetro a 546 nm, utilizando cubetas plásticas, midiendo contra un blanco preparado reemplazando la muestra por agua destilada.

La concentración de gelatina de la muestra se determina a partir de la ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración de proteína, obtenida de la recta de calibrado, considerando la dilución correspondiente.

2.3.1.e Amonio

La medida de amonio se determina espectrofotométricamente a 635 nm por medio del método del fenol-hipoclorito descrito por Weatherburn (1967). La técnica se basa en la reacción del amonio en medio alcalino con fenol para producir una coloración azul (azul indofenol) en presencia de hipoclorito como agente

fuertemente oxidante. La reacción puede realizarse a temperatura ambiente o puede ser acelerada calentándola a 35°C o agregando como catalizador nitroprusiato de sodio.

La presencia de iones calcio y magnesio puede causar problemas de precipitación durante el análisis y para prevenirlo se agrega una dilución de EDTA al 5%. Muestras que presenten turbidez o color pueden llevar a resultados erróneos. Para eliminar la turbidez la muestra debe ser filtrada previamente a la reacción del análisis, mientras que el color puede interferir cuando presente absorción a una longitud de onda cercana a los 635 nm.

Previo a la medida de las muestras se realiza un calibrado con una solución patrón conocida en el intervalo entre 0-1 mg N-NH₄⁺/L. El calibrado debe ser realizado cada vez que se reemplace un reactivo.

Se utilizan dos reactivos, R1 (0,05 g de nitroprusiato de sodio y 15 g de fenol en 250 mL de buffer formado por 30 g de fosfato trisódico hidratado, 30 g de citrato de sodio y 3 g de EDTA aforado a 1 litro) R2 (15 mL de solución comercial de cloro y 200 mL de hidróxido de sodio 1 N, aforado a 500 mL).

El procedimiento es el siguiente:

- Transferir 2,5 mL de muestra a un tubo de ensayo de 10 mL, considerando la dilución correspondiente para el rango de linealidad de la recta de calibración;
- Agregar 1 mL de reactivo R1 y 1,5 mL de reactivo R2. Homogeneizar durante 5 segundos en el vortex y esperar a temperatura ambiente durante 45 minutos;
- Leer en espectrofotómetro a 635 nm, midiendo contra un blanco preparado reemplazando la muestra por agua destilada.

La concentración de amonio de la muestra se determina a partir de la ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración del patrón, obtenida de la recta de calibrado, considerando la dilución correspondiente.

2.3.1.f pH

Las medidas de pH se llevan a cabo con un electrodo Crison Instruments, S.A. (cat. n° 52-02) conectado a un medidor de pH/mV Crison Instruments, S.A. pH/mV modelo 507. La sensibilidad del medidor es de ± 1 mV, lo que corresponde a 0,01 unidades de pH.

Antes de medir, se realiza un calibrado con dos disoluciones tampón estándar (Crison Instruments S.A.) de pH 7,02 y 4,00 medidas a 20°C.

2.3.1.g Demanda Química de Oxígeno (DQO) total y soluble

La determinación de la DQO representa un parámetro conveniente para la medida de la materia orgánica oxidable por procedimientos químicos. Este método tiene la ventaja de requerir dos horas de digestión en comparación con la determinación de la DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) que precisa normalmente de cinco días. La DQO se define como la cantidad de oxígeno equivalente (mg/L o g/L) que hace falta para oxidar químicamente todos los compuestos oxidables presentes en el agua.

Para la mayoría de los compuestos orgánicos, la DQO representa el 95-100% de la DTO (Demanda Teórica de Oxígeno), que se calcula según una base estequiométrica.

El equipo necesario para realizar la determinación de DQO está compuesto por un bloque calefactor Velp científica, modelo ECO 16, un agitador magnético Hanna HI190M y una bureta para llevar a cabo la valoración.

Las disoluciones empleadas son las siguientes:

- Solución digestora: 10,216 g $K_2Cr_2O_7$ y 33 g $HgSO_4$ disueltos en 500 mL de agua, a los que se añaden 167 mL de H_2SO_4 comercial;
- Solución catalítica: 10,7 g Ag_2SO_4 en 1 L de H_2SO_4 concentrado;
- Solución de Ferroína: 1,485 g $C_{18}H_8N_2 \cdot H_2O$ (fenantrolina monohidrato) y 0,695 g $SO_4Fe \cdot 7H_2O$ disueltos en 100 mL de agua;

- Solución FAS: 13,72 g $\text{Fe}(\text{NH})_4(\text{SO})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ disueltos en agua destilada, a los que se añaden 20 mL de H_2SO_4 concentrado y posteriormente diluidos a 1000 mL;
- Solución estándar de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,05 N.

Considerando un valor previsto de la DQO, se hace una dilución de las muestras para entrar dentro del rango de medida (90-900 mg DQO/L). Se toman 2,5 mL de la muestra diluida en un tubo Pyrex de 10 mL, se añaden 1,5 mL de solución digestora y 3,5 mL de disolución catalítica. La adición de esta última se debe hacer de modo que no se produzca la mezcla de la solución catalítica con la muestra hasta el momento de comenzar la digestión en el bloque calefactor.

Para el blanco, se prepara un tubo con 2,5 mL de agua destilada con las mismas cantidades de solución digestora y catalítica.

Los tubos se sellan con Teflon y se cierran con tapa de bakelita. Una vez cerrados se procede a la mezcla de la muestra y se introducen en el bloque calefactor a 150°C durante dos horas.

A continuación, los tubos se dejan enfriar hasta temperatura ambiente. Luego, se añade una gota de ferroína y se valoran con disolución FAS, hasta el viraje azul-rojo. Posteriormente se valora el FAS hasta alcanzar el punto de viraje azul-rojo sobre 5 mL de solución estándar $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,05 N. Las valoraciones se llevan a cabo en un Erlenmeyer de 50 mL en el que se mantiene la muestra homogeneizada mediante un agitador magnético.

La concentración de DQO, se calcula según la siguiente expresión:

$$DQO \text{ (mg/L)} = \frac{(B - A) \cdot N_{FAS} \cdot 8000}{2,5} \cdot F_d$$

Siendo B y A los volúmenes (mL) de FAS de valoración del blanco y de la muestra analizada, respectivamente, F_d el factor de dilución y N_{FAS} la normalidad de la solución de FAS, que se calcula a partir de:

$$N_{FAS} = \frac{5 \cdot 0,05}{C}$$

en donde C es el volumen de valoración de la solución de FAS en mL.

La determinación de la DQO total se realiza sobre la muestra bruta, mientras que la determinación de la DQO soluble se realiza sobre la muestra previamente filtrada con un filtro de 0,45 µm.

2.3.1.h Carbono Orgánico Total (COT)

El Carbono Orgánico Total (COT) es una medida directa del contenido de materia orgánica total en el agua residual (APHA-AWWA-WPCF, 1998). La determinación del COT es más rápida que la de DQO, aunque requiere un equipamiento más caro y complejo.

El COT se determina mediante un analizador Shimadzu TOC-5000, calculándolo como la diferencia entre el Carbono Total (CT) e Inorgánico (CI) en la muestra. Se utiliza aire de alta pureza como gas portador a 150 mL/min. El equipo determina el carbono total 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 carbono inorgánico se obtiene a partir del CO₂ que se produce por reacción con H₃PO₄ 25%. El CO₂ se mide ópticamente, después de haberle eliminado la humedad, en un detector de Infra-Rojo No-Dispersivo (NDIR).

2.3.1.i Nitrógeno NTK

El Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK) comprende el nitrógeno orgánico y el nitrógeno amoniacal (APHA-AWWA-WPCF, 1998).

El NTK se mide en un analizador de nitrógeno orgánico total Dohrmann DN-1900, determinándose como la diferencia entre el Nitrógeno Total (NT) y el Nitrógeno Inorgánico (NI). El gas portador es oxígeno con un 99,999% de pureza. El nitrógeno total se computa a partir del NO₂ que se produce durante la combustión catalítica (Cu) de la muestra a 850°C. Posteriormente, mediante una reducción química con H₂SO₄ catalizada por VaCl₃ a 80°C se determina el NI (NO₃⁻, NO₂⁻). Se elimina la humedad al nitrógeno orgánico producido en esta reacción y se hace reaccionar con O₃ para obtener NO₂ en un estado excitado. La vuelta de este óxido a su estado fundamental provoca la emisión de un protón, a

partir del cual se puede llevar a cabo la determinación de NI mediante quimioluminiscencia, empleando un tubo multiplicador.

2.3.1.j Ácidos grasos volátiles (AGV)

Se denominan Ácidos Grasos Volátiles (AGV) a los ácidos acético, propiónico, i-butírico, n-butírico, i-valérico y n-valérico, y su presencia se debe a que son productos intermedios en la digestión anaerobia. Los AGV se determinan mediante cromatografía gaseosa empleando un equipo Hewlett Packard 5890A con un detector de ionización de llama (FID), conectado a un inyector automático Hewlett-Packard 7673A. Se utiliza una columna de vidrio rellena con Chromosorb WAW (web 100/120) impregnado con NPGA 25% y H₃PO₄ 2% (300 mm de longitud y 2 mm de diámetro interno). La temperatura del inyector es de 260°C y la temperatura de la columna 105°C. Los AGV, después de ser separados en la columna, en función de sus diferentes pesos moleculares, son quemados en una llama de H₂-aire y medidos con el FID a 280°C. El rango de medida de concentración es de 50-1500 mg/L.

El gas portador es nitrógeno saturado con ácido fórmico antes de entrar en el inyector, con un caudal de 24 mL/min. Como gases auxiliares se utilizan aire e hidrógeno con caudales de 400 y 30 mL/min, respectivamente. Los análisis se realizan empleando ácido trimetil acético (ácido piválico) como patrón interno.

2.3.2 Fase sólida

2.3.2.a Sólidos en suspensión totales (SST) y sólidos en suspensión volátiles (SSV)

Los sólidos contenidos en el agua pueden encontrarse en disolución o en suspensión, y estos pueden a su vez clasificarse en orgánicos e inorgánicos. Los Sólidos en Suspensión Totales (SST) se determinan mediante la filtración de la muestra para eliminar el agua. Los Sólidos en Suspensión Volátiles (SSV) se definen como aquellos que volatilizan a una temperatura inferior a 550°C, y de hecho constituyen una medida bastante exacta de los sólidos orgánicos –las diferencias pueden ser debidas a algunas sales minerales que volatilizan o que se descomponen a esas temperaturas (APHA-AWWA-WPCF, 1998).

Los SST se determinan por filtración de un volumen conocido de muestra con filtros de fibra de vidrio Whatman (modelo GF/C, de 4,7 cm de diámetro) y posteriormente son secados a 103-105°C. La diferencia de peso de los filtros antes y después del secado permite calcular el contenido de SST. Los sólidos volátiles se cuantifican mediante la ignición de la muestra a alta temperatura (550°C) en una mufla (Selecta, Mod. Select Horn). Los SSV, se determinan por diferencia de peso de la muestra entre la salida de la estufa (donde se produce la evaporación del agua) y la salida de la mufla (calcinación de los sólidos).

Para estos análisis se utilizan los métodos 209 A, 209 C y 209 D, descritos en el Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF, 1998).

2.4 Referencias

- APHA-AWWA-WPCF (1998) *Standard methods for examination of water and wastewater.*, 20th Ed. Washington.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, **28** (3), 350-355.
- Gornall,A.G., Bardawill,C.J., and David,M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **177** (2), 751-766.
- Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L., and Randall,R.J. (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, **193** (1), 265-275.
- Miller,G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31** (3), 426-428.
- Peterson G.L. (1977) A simplification of the protein assay of Lowry which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, **83**, 346-351.
- 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.
- Watters,C. (1978) One-step Biuret assay for protein in presence of detergent. *Analytical Biochemistry*, **88** (2), 695-698.
- Weatherburn,M. (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, **39** (8), 971-974.

CAPÍTULO TERCERO

Hidrólisis-acidogénesis anaerobia de almidón

RESUMEN

En este capítulo se aborda el proceso de hidrólisis/acidogénesis anaerobia de macromoléculas en condiciones psicrófilas, tomando como molécula modelo almidón soluble de 160 kDa de tamaño molecular. El estudio incluye ensayos en batch y un estudio en continuo que se extendió durante 308 días, para analizar el comportamiento de cuatro configuraciones de reactor (RCTA con reciclo de biomasa, reactor de lecho ascendente y acoplamiento de un equipo de ultrafiltración tangencial en ambos casos). Los resultados indican que es posible operar en condiciones psicrófilas a VCO elevadas ($24 \text{ g}_{\text{almidón}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$), con TRH de 3 h y una concentración de 3 g/L de almidón, aumentando la actividad hidrolítica de la biomasa en aproximadamente 15 veces, en relación al inóculo original. Sin embargo, la actividad acidogénica no se ve incrementada de forma equivalente. La eficacia de hidrólisis del reactor anaerobio fue superior al 93%. En la operación con el reactor RCTA con reciclo de biomasa, se obtiene un efluente con cerca de un 50% de moléculas de tamaño molecular mayor que 1 kDa y una fracción del 20% mayor que 10 kDa. La operación con la configuración de lecho ascendente permitió trabajar con mayores VCO al haber desarrollado biomasa de mejor sedimentabilidad. Así, se alcanzó una elevada eficiencia de hidrólisis y acidificación, 95% y 80%, respectivamente. El acoplamiento de un equipo de ultrafiltración tangencial, para ambas configuraciones, permite alcanzar una hidrólisis prácticamente completa obteniendo un efluente fácilmente biodegradable rico en moléculas sencillas, mayormente una mezcla de AGV, todas de tamaño inferior a 1 kDa. La acidificación de la materia orgánica alimentada, en los sistemas con UF, es del 70% para el reactor RCTA y se eleva hasta el 90% en el caso del lecho ascendente.

INDICE

3.1	INTRODUCCIÓN	3-3
3.2	OBJETIVOS	3-7
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	3-7
3.3.1	<i>Ensayos en discontinuo</i>	3-7
3.3.2	<i>Ensayos en continuo</i>	3-8
3.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	3-14
3.4.1	<i>Caracterización del inóculo</i>	3-14
3.4.2	<i>Ensayos en discontinuo</i>	3-15
3.4.3	<i>Ensayos en continuo</i>	3-19
3.5	CONCLUSIONES	3-35
3.6	REFERENCIAS	3-36

3.1 Introducción

La actividad humana genera importantes volúmenes de aguas residuales cuya composición dependerá de su origen, distinguiéndose las aguas residuales domésticas, o urbanas, y las aguas residuales industriales. Las primeras, de características más constantes, han sido abordadas preferentemente mediante el uso de sistemas aerobios. En el caso de las aguas residuales industriales la solución dependerá de cada caso en particular, siendo fuertemente dependiente del contenido de material complejo, particulado, tóxicos, químicos, etc.

El proceso de digestión anaerobia ha sido exitosamente aplicado a una amplia variedad de aguas residuales, incluyendo las aguas urbanas, aunque en ese caso el éxito se ha limitado a la operación en climas cálidos, pues prácticamente todas las instalaciones a gran escala están restringidas a aguas residuales con temperaturas superiores a 18°C (Lettinga *et al.*, 2001). A pesar de que hoy en día se considera que los sistemas anaerobios son una tecnología consolidada, aún existen una serie de limitaciones en su aplicación (Field, 2002; Schink, 2002), desarrollándose múltiples investigaciones con el fin de extender su aplicabilidad.

Así, uno de los aspectos considerados es la degradación de macromoléculas y material particulado, abarcando el estudio del efecto del pH (Perot y Amar, 1989; Chyi y Dague, 1994; Yu *et al.*, 2003), temperatura (Banerjee *et al.*, 1998; Ferreiro y Soto, 2003; Chu *et al.*, 2005), tiempo de residencia (Gonçalves *et al.*, 1994; Maharaj y Elefsiniotis, 2001; Mahmoud *et al.*, 2004b) y configuración del reactor (Zhang y Noike, 1991; Jeyaseelan y Matsuo, 1995; Kalyuzhnyi *et al.*, 2001; Mahmoud *et al.*, 2004a), entre otros.

En general, las investigaciones se han enfocado desde el punto de vista de la metanización de los residuos, con el fin de obtener rendimientos energéticos favorables; sin embargo, en presencia de material particulado el proceso de hidrólisis/acidogénesis es el limitante (Ferreiro y Soto, 2003), siendo necesario buscar condiciones que permitan aumentar la solubilización de dichos materiales. El efecto del pH ha sido el menos estudiado. Chyi y Levine (1992) analizaron la hidrólisis/acidogénesis mesófila de celulosa particulada a 35°C, determinando que el grado de solubilización (expresado como conversión de DQO en DQO soluble)

depende directamente del tiempo de retención hidráulico (17% con TRH de 24 h; 44% con TRH 48 h), con un óptimo de pH entre 5,2 y 6,0. Mediante ensayos con lodos primarios, Eastman y Ferguson (1981) establecieron que el grado de solubilización aumentaba con el aumento de pH, no encontrando un óptimo en el rango estudiado (5-7). La influencia del parámetro de tiempo de residencia está ligada a la temperatura de operación del sistema estudiado. Así, los estudios realizados indican que a baja temperatura se dificulta la hidrólisis de sólidos en suspensión (Uemura y Harada, 2000) o de macromoléculas, en general (Lettinga *et al.*, 1999; Elmitwalli *et al.*, 2001), de manera que en sistemas en una sola fase no es posible la operación con TRH cortos, incrementándose el volumen requerido de reactor, lo que finalmente encarece los costes. Una investigación llevada a cabo para la digestión de lodo primario (Mahmoud *et al.*, 2004a) demostró que a 25° C se requiere un tiempo de residencia de sólidos (TRS) de 15 días para solubilizar la mayor parte del sustrato, mientras que a 35°C el TRS requerido es de 10 días. Datos presentados por (Maharaj y Elefsiniotis, 2001) muestran que la temperatura también afecta la acidificación de los sustratos, en cuanto a la distribución de ácidos grasos de cadena corta.

En la última década ha habido un gran interés en desarrollar procesos anaerobios que muestren ser eficaces en condiciones de temperatura desfavorables (Lettinga *et al.*, 1999; Bodik *et al.*, 2000; Kalyuzhnyi *et al.*, 2001; Ferreiro y Soto, 2003), ya que tradicionalmente el uso de esta tecnología estaba limitada a la operación en rango mesófilo y, en algunos casos, termófilo. Lettinga *et al.* (2001) analizan las principales limitaciones asociadas a la operación en condiciones psicrófilas, siempre desde un punto de vista metanogénico, estableciendo las limitaciones asociadas al tratamiento de aguas residuales diluidas y las de tipo complejo (alto contenido de material particulado). Así, partiendo de la base de que a baja temperatura las reacciones químicas y biológicas son mucho más lentas que en condiciones mesófilas, se tiene que la eficacia de un sistema anaerobio, operado a baja temperatura, dependerá principalmente de los siguientes factores:

- calidad del inóculo utilizado y su desarrollo bajo condiciones subóptimas,
- composición del residuo o agua residual, y

- diseño y configuración del reactor, de manera que sea posible retener la máxima cantidad de lodo aun en las condiciones más desfavorables de carga hidráulica, y que permita el mayor contacto entre el lodo y el sustrato.

Muchos autores han planteado el concepto de separación de fases con el fin de realizar la etapa de hidrólisis/acidogénesis a manera de pretratamiento, evitando que se produzca metanización (Gonçalves *et al.*, 1994; Maharaj y Elefsiniotis, 2001; Ligeró *et al.*, 2001; Halalsheh *et al.*, 2005). El efluente de esta etapa, posteriormente, puede ser tratado en sistemas aerobios o anaerobios, o también ser utilizado en sistemas de remoción de nutrientes (Gonçalves *et al.*, 1994; Maharaj y Elefsiniotis, 2001). Para llevar a cabo este proceso se han utilizado diversas configuraciones de reactores, desde los tradicionales RCTA (Banerjee *et al.*, 1998; Maharaj y Elefsiniotis, 2001; Mahmoud *et al.*, 2004b), pasando por los reactores UASB y EGSB (Uemura y Harada, 2000; Bodik *et al.*, 2000; Kalyuzhnyi *et al.*, 2001; Halalsheh *et al.*, 2005), hasta sistemas más sofisticados como los reactores de membranas, si bien para este último caso la experiencia es limitada.

Si bien, la principal aplicación de los reactores de membranas es la retención de biomasa en sistemas aerobios con el fin de mejorar la eficiencia de los reactores de lodos activos (Marrot *et al.*, 2004), también se ha planteado su utilización en los procesos anaerobios (Brindle y Stephenson, 1996; Mulder *et al.*, 2001). Chu *et al.* (2005) presentaron los resultados de la operación de un reactor EGSB acoplado a una membrana de fibra hueca de 0,1 μm de tamaño de poro para el tratamiento a baja temperatura de un agua doméstica sintética. Fakhru'l-Razi (1994) reporta el uso de una membrana de ultrafiltración (10 kDa de tamaño de corte molecular) para la retención de biomasa en un sistema que trataba agua residual de la industria cervecera. Desde otro enfoque, las membranas también han sido utilizadas para mejorar la degradación de material particulado. Harada *et al.* (1994) probaron el comportamiento de un reactor anaerobio acoplado a un ultrafiltro (3000 kDa de tamaño de corte molecular) tratando un agua residual sintética que incluía celulosa como material particulado. El sistema se operó a

35°C durante 190 días, alcanzado una degradación del 98% para una velocidad de carga orgánica (VCO) máxima de 2,5 kg_{DQO}/m³·d.

La mayor parte de las investigaciones realizadas se han centrado en la problemática de los lodos primarios de depuradora y de aguas residuales con elevado contenido de sólidos, aunque existen referencias limitadas en relación con el estudio de sustratos modelo de elevado tamaño molecular (macromoléculas), representativos de proteínas, carbohidratos y lípidos. Específicamente, en el caso de los carbohidratos, aunque se ha estudiado extensamente su cinética de degradación (Fang y Kwong, 1994; Fox y Pohland, 1994; Mino *et al.*, 1995; Inanc *et al.*, 1999; Miron *et al.*, 2000; Barker y Stuckey, 2001; Ueno *et al.*, 2001), existe información limitada acerca de la distribución de tamaños moleculares obtenida para distintas condiciones de operación (TRH, pH, temperatura, tipo de reactores, etc.). Confer y Logan (1997) estudian la hidrólisis aerobia de dextrano y dextrina, analizando la distribución de tamaños de los fragmentos hidrolizados liberados al medio. Ubukata (1999) estudió la cinética y el mecanismo de degradación de almidón, también en un proceso aerobio, analizando su paso limitante y la distribución de tamaños moleculares. En los procesos anaerobios, el almidón ha sido utilizado recurrentemente como molécula modelo, llevándose a cabo estudios con diversos objetivos: cinética de hidrólisis de materiales particulados (Sanders *et al.*, 2000); características de gránulos metanogénicos (Fang *et al.*, 1995); producción de hidrógeno (Lay, 2000); proceso de acidogénesis (Cohen *et al.*, 1984), etc.

El almidón se define básicamente como un polímero de glucosa formado por dos tipos de moléculas, amilosa y amilopectina. La primera es considerada como una cadena lineal en la cual las unidades de glucosa están unidas por enlaces α 1-4, esta molécula suele tener entre 500 y 2000 unidades. La otra molécula, es similar a la primera, aunque presenta ramificaciones en uniones α 1-6. El grado de ramificación es de aproximadamente 1 cada 25-30 unidades lineales de glucosa. La proporción entre una y otra molécula en el almidón, dependerá de su origen, teniendo por regla general entre un 20 y 30% de amilosa; mientras que existe una variedad de almidón de patata y almidón que tiene mas de un 80% de amilosa.

Las moléculas de almidón pueden ser hidrolizadas, eventualmente, hasta la unidad básica, glucosa. Para ello se requiere la acción de tres enzimas (van der Maarel *et al.*, 2002): i) α -amilasa, endoenzima con capacidad de atacar enlaces α 1-4 internos de las moléculas, liberando oligosacáridos tamaño variable y maltodextrinas u oligosacáridos ramificados, esto último debido a que esta enzima no puede atacar los enlaces α 1-6; ii) glucoamilasa o amiloglucosidasa, exoenzima que actúa en el extremo no reductor de las cadenas, rompiendo el enlace α 1-4, liberando unidades de glucosa. Tiene algún grado actividad sobre los enlaces α 1-6; iii) y maltasa o α -glucosidasa, que actúa sobre las moléculas de maltosa, liberando unidades de glucosa.

3.2 Objetivos

El objetivo de este capítulo es estudiar la influencia de parámetros de operación (temperatura y TRH) y de diseño (configuración de reactores en ensayos en continuo), con el fin de determinar las mejores condiciones para el proceso de hidrólisis-acidificación anaerobia de carbohidratos complejos en condiciones psicrófilas, considerando como molécula modelo al almidón soluble de patata. El proceso busca obtener un efluente rico en moléculas de pequeño tamaño molecular (menor que 1 kDa), fácilmente metabolizable en una segunda etapa de tratamiento.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Ensayos en discontinuo

La fase de experimentación en discontinuo comprendió ensayos de degradación de almidón soluble a dos temperaturas y bajo diferentes condiciones de tamponamiento (análisis de la influencia del pH). En dichos ensayos se observó la variación del pH en los medios, junto con el seguimiento de la hidrólisis de almidón, y generación/consumo de glucosa. El procedimiento seguido corresponde, en términos generales, a la metodología descrita para los ensayos de actividad hidrolítica (2.2.1). Los ensayos se dieron por finalizados en el momento en que los niveles de almidón en el medio alcanzaron un valor mínimo estable.

Las características de los ensayos realizados se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Características de los ensayos de hidrólisis de almidón soluble.

Temperatura	15 y 37°C
Nutrientes	No se agregaron
Sustrato	Almidón de patata soluble (Panreac): 1,5 g/L - Sin bicarbonato, pH inicial ajustado a 7 (SB)
Bicarbonato de sodio	- 1,5 g/L de bicarbonato, pH inicial ajustado a 7 (CB) - 1,5 g/L de bicarbonato, pH inicial sin ajustar (BL)
Inóculo	Lodo metanogénico granular: 1,1 g _{SSV} /L – 2,5 g _{SSV} /L
Agitación	Estático

3.3.2 Ensayos en continuo

3.3.2.a Equipamiento experimental

Para la realización de los ensayos en continuo se utilizó un reactor enchaquetado de 2 litros de volumen útil. El reactor tiene acoplado:

- equipo recirculador para el control de temperatura en 15°C (Poly Science, modelo 911)
- sensor de temperatura pT 100
- sensor de pH (Hamilton, modelo Easyferm 325)
- transmisor digital para monitorear el valor de pH y temperatura dentro del reactor (LabProcess, modelo DO9765T)
- agitador de velocidad variable con pala de Teflon y eje de vidrio (Heidolph, modelo RZR 2020)
- bombas peristálticas de alimentación y recirculación (Masterflex, modelo Console Drive 7520-57 1-100 rpm. Ambas con cabezales Easy Load y goma L/S16 Tygon LFL).

En la Figura 3.1 se muestra una fotografía del reactor, así como de los principales equipos acoplados.

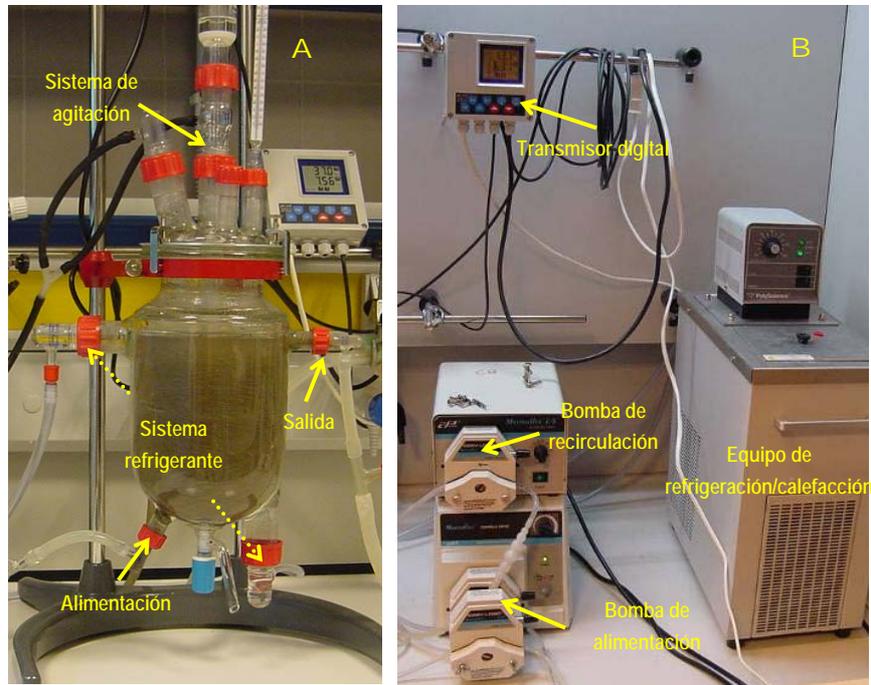


Figura 3.1. (A) Reactor enchaquetado. (B) Sistema de bombeo, monitoreo (pH y temperatura) y refrigeración.

Durante la realización de los experimentos se ensayaron cuatro configuraciones:

- reactor de mezcla completa (RCTA) con sedimentador secundario y reciclo de biomasa.
- reactor agitado de “lecho ascendente” con biomasa granular
- los dos anteriores con conexión a un sistema de ultrafiltración tangencial.

En las Figuras 3.2 y 3.3 se muestran esquemas de las configuraciones descritas y en la Figura 3.4 un esquema del sistema de ultrafiltración acoplado.

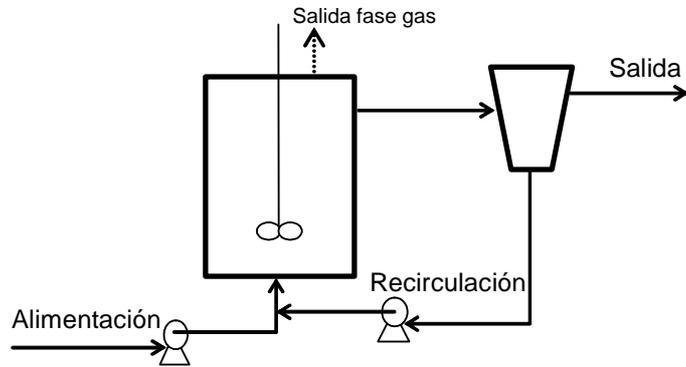


Figura 3.2. Reactor RCTA con recirculación de biomasa.

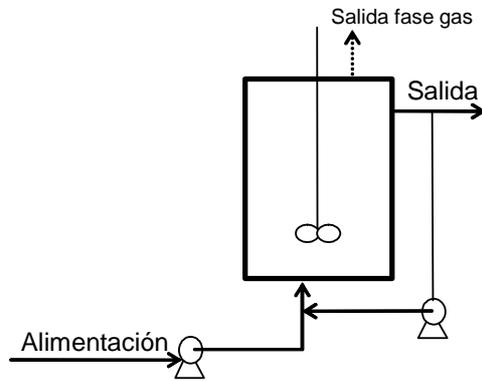


Figura 3.3. Reactor agitado de lecho ascendente.

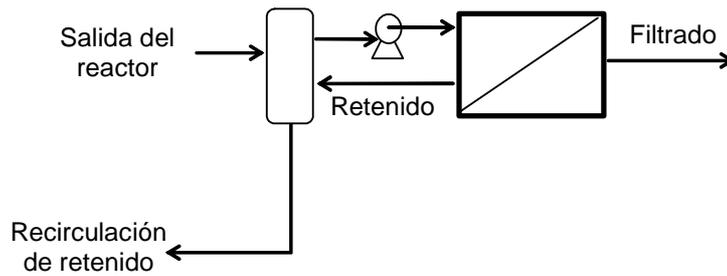


Figura 3.4. Sistema de ultrafiltración tangencial.

El sistema de ultrafiltración tangencial utilizado es del tipo Minisette, de la casa Comercial "Filtron". El equipo se muestra en la Figura 3.5 y sus características se resumen en la Tabla 3.2.

Durante la operación con dicho sistema se acopló una bomba (Masterflex, modelo 7553-75 6-600 rpm, goma Pharmed L/S 15 para alta presión) para la alimentación del ultrafiltro y otra para la recirculación hacia el reactor de una fracción de la corriente de retenido (Masterflex, modelo Console Drive 7520-57, 1-100 rpm, goma L/S 16 Pharmed). Se utilizó una membrana de 10 kDa de tamaño de corte molecular, de tipo Omega de canal abierto, fabricada en PES (polietersulfonato). Se seleccionó el tipo de canal abierto debido a que la corriente que va a ser procesada proviene de la salida del reactor por lo que tiene una elevada cantidad de sólidos suspendidos, de esta manera es posible operar por periodos de tiempo mas prolongados sin que aumente la caída de presión del sistema sobre los niveles permitidos por el equipo debido al taponamiento de los poros de la membrana.

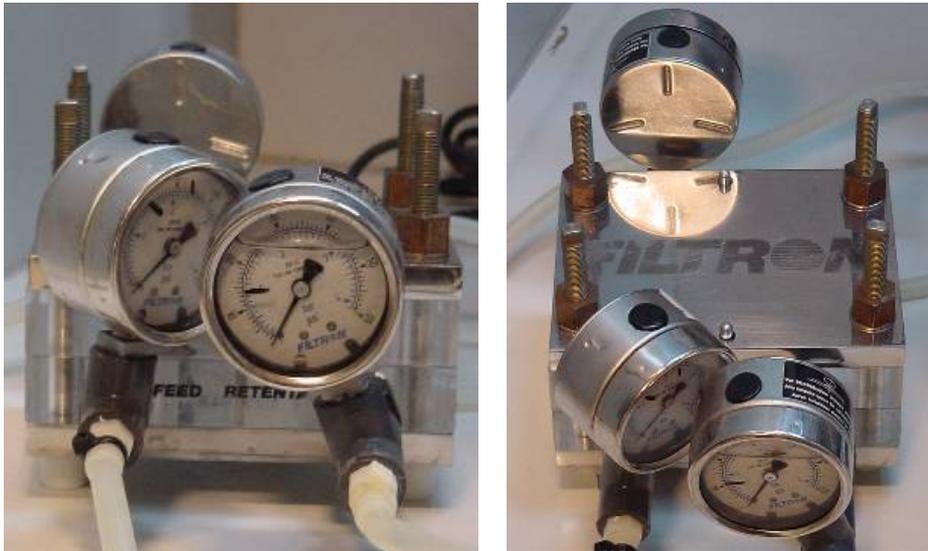


Figura 3.5. Sistema de ultrafiltración tangencial. Vista frontal y superior.

Tabla 3.2. Características del equipo de ultrafiltración tangencial.

Área superficial de la membrana	0,07 m ² /cassete
Número máximo de cassetes utilizables	5
Presión de operación recomendada	5-75 psig
Temperatura máxima de operación	70°C

En la Figura 3.6 se muestra un esquema de la configuración utilizada para la operación del reactor con el equipo de ultrafiltración tangencial acoplado y en la Figura 3.7 una fotografía del sistema operado.

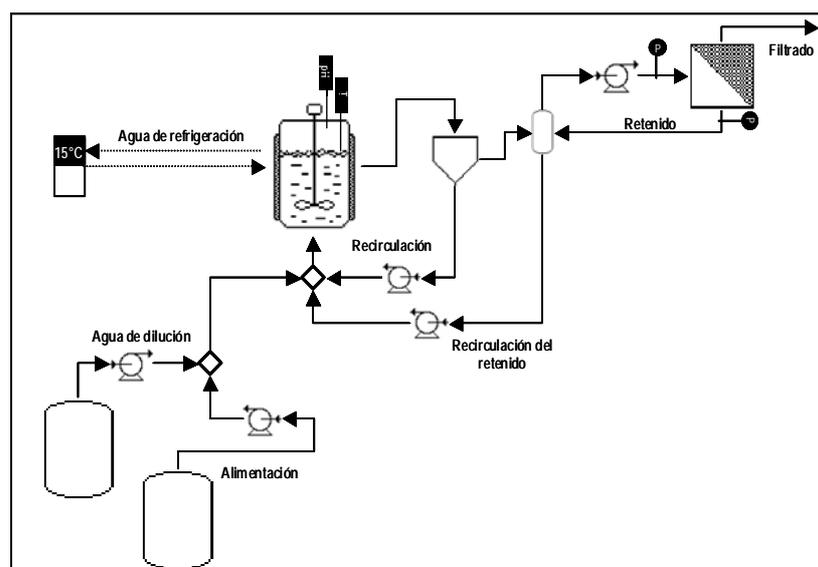


Figura 3.6. Esquema de la configuración utilizada para la operación del reactor con el equipo de ultrafiltración tangencial acoplado.



Figura 3.7. Sistema utilizado para la operación del sistema con el equipo de ultrafiltración tangencial acoplado.

El sistema de ultrafiltración se opera en continuo considerando la recirculación del retenido al reactor, con caudales entre 3 y 33 mL/min dependiendo de las condiciones ensayadas, y ciclos de lavado periódicos. El caudal de alimentación al ultrafiltro se fija por medio de la manipulación de la presión de alimentación y de retenido, respetando los valores mínimos y máximos propios del equipo, tratando de mantener un caudal de filtrado aproximadamente igual al caudal de alimentación al sistema.

El ciclo de limpieza consta de las siguientes fases:

1. enjuague del ultrafiltro con la corriente filtrada con el fin de remover partículas que pudieran adherirse a la membrana por la acción del medio alcalino de limpieza. Se descartan el retenido y el filtrado.
2. circulación de una solución de limpieza (NaOH 0,5 N + hipoclorito de sodio 200 mg/L) durante 1 minuto, descartando el retenido junto con el filtrado. Luego, poner la línea de retenido en la alimentación, estrangular un poco esta línea con el fin de asegurar la purga de la línea de filtrado. Dejar circular la solución 1 minuto más.
3. recirculación de la solución de limpieza durante 30 a 45 minutos., asegurando una presión de alimentación entre 25 y 40 psig.
4. enjuague del sistema con agua destilada hasta que el pH de la corriente de retenido sea neutro. Estrangular por turnos la línea de retenido y luego del filtrado para asegurar la correcta purga del agente de limpieza.

3.3.2.b Metodología analítica

El seguimiento de los reactores se llevó a cabo por medio del monitoreo de las corrientes de entrada y salida del sistema, y un punto intermedio (salida del reactor) para el caso de la operación con acoplamiento del sistema de ultrafiltración. Los parámetros críticos a analizar fueron la eficiencia de remoción de almidón, concentración de AGV, azúcares reductores (glucosa) y sólidos suspendidos. La eficiencia obtenida para cada configuración ensayada se estableció por medio del análisis de la distribución de tamaños moleculares.

Todos los procedimientos de los análisis mencionados fueron descritos en el Capítulo 2 en los apartados correspondientes.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Caracterización del inóculo

Para la realización de las cinéticas de hidrólisis de almidón en los ensayos en discontinuo y luego como inóculo de los sistemas en continuo, se utilizó lodo metanogénico granular proveniente de un UASB que trata efluentes de una papelera ubicada en Zaragoza (SAICA). Sus características comparativas en función de la temperatura de operación se presentan en la Figura 3.8. Las determinaciones de actividad se hicieron utilizando la metodología descrita en los puntos 2.3.1, 2.3.2 y 2.3.3. El lodo anaerobio utilizado como inóculo tenía un 57,8% de materia orgánica y una actividad metanogénica de $0,47 \text{ g}_{\text{DQO-CH}_4}/\text{g}_{\text{SSV}\cdot\text{d}}$.

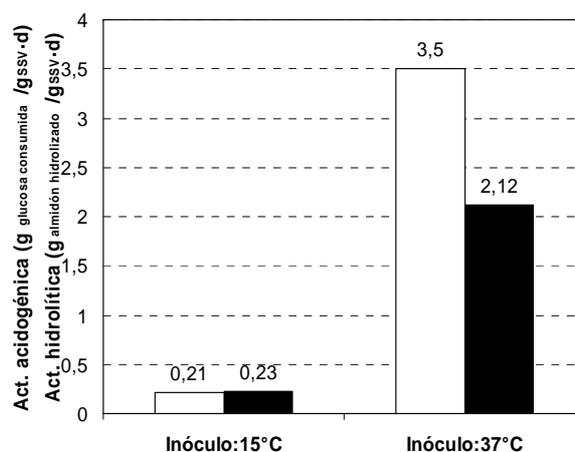


Figura 3.8. Caracterización del lodo anaerobio utilizado como inóculo, en relación a los valores de actividad acidogénica (blanco) y actividad hidrolítica (negro).

Como se observa, los valores de las actividades consideradas son muy diferentes para las temperaturas estudiadas, siendo más importante el efecto que presenta la temperatura sobre el proceso de acidificación, ya que pasa a ser una etapa limitante cuando se opera a baja temperatura. Valores similares de actividad acidogénica fueron obtenidos para sacarosa a 8°C (Rebac *et al.*, 1998).

3.4.2 Ensayos en discontinuo

Los ensayos en discontinuo realizados según el protocolo descrito en el apartado 3.3.1, mostraron comportamientos similares. A modo de ejemplo, en la Figura 3.9 se presentan las cinéticas de hidrólisis de almidón, generación/consumo de glucosa y variación de pH, obtenidas para un ensayo a 15°C con lodo metanogénico no adaptado a almidón.

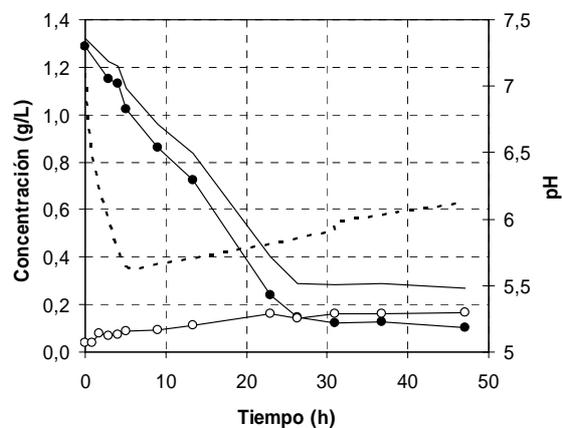


Figura 3.9. Cinética de hidrólisis de almidón soluble (●), variación en la concentración de glucosa (○), variación en la concentración de azúcares totales (—) y valor de pH (---) del medio. Ensayo a 15°C con lodo metanogénico no adaptado.

En esta figura se observa la velocidad de hidrólisis de almidón, proceso que libera glucosa al medio. Sin embargo, el perfil de glucosa corresponde al resultado del balance entre la velocidad de generación y la velocidad de consumo de glucosa, pues si este compuesto no estuviera siendo metabolizado entonces los azúcares totales se mantendrían constantes. De esta manera, el hecho de que se acumule glucosa en el medio hace pensar que la velocidad de acidificación es menor que la velocidad de hidrólisis, lo que concuerda con la relación que existe entre los valores de actividad hidrolítica y acidogénica a 15°C (ver Figura 3.8). Este comportamiento no se observó en los ensayos a 37°C, en donde la actividad acidogénica es mayor que la hidrolítica, por lo tanto la concentración de glucosa se mantuvo en un nivel basal, no existiendo acumulación en el medio.

Los resultados correspondientes a los ensayos realizados con capacidades de tamponamiento variables, a 15°C se presentan en la Figura 3.10 para la variación del pH y en la Figura 3.11 para los perfiles de hidrólisis de almidón y generación / consumo de azúcares reductores, expresados como glucosa.

Como se observa, en todos los ensayos realizados se obtienen comportamientos semejantes, lo que se puede resumir de la siguiente manera:

- independiente de la capacidad tampón presente en el medio, el pH disminuye debido a la acumulación de ácidos grasos volátiles. El aumento del valor de pH hacia el final del ensayo se debería al consumo de los AGV, con la consiguiente generación de metano. De esta manera, el pH final de cada experimento depende de la cantidad de bicarbonato añadido.

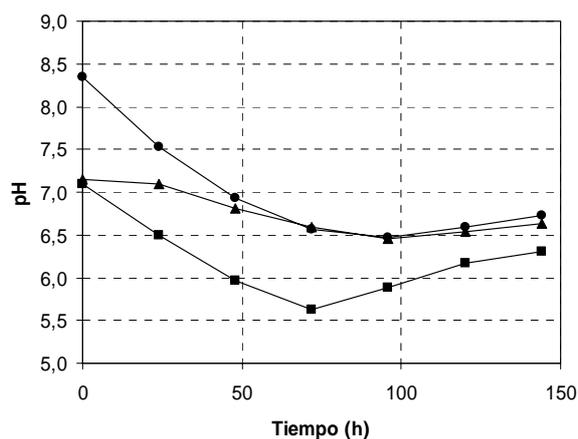


Figura 3.10. Variación del pH durante la hidrólisis de almidón a 15°C, en presencia de distintas capacidades de tamponamiento. BL(●): adición de bicarbonato, pH inicial sin ajustar; SB (■): sin adición de bicarbonato, pH inicial 7,0; CB(▲): adición de bicarbonato, pH inicial 7,0.

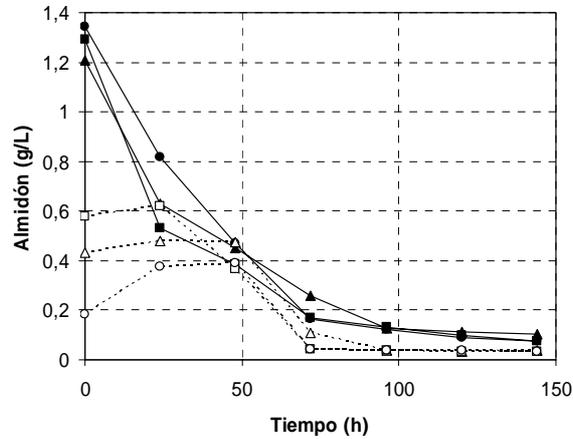


Figura 3.11. Perfil de hidrólisis de almidón (—) y generación / consumo de glucosa (--) durante la degradación de almidón a 15°C, en presencia de distintas capacidades de tamponamiento. BL(●): adición de bicarbonato, pH inicial sin ajustar; SB(■): sin adición de bicarbonato, pH inicial 7,0; CB(▲): adición de bicarbonato, pH inicial 7,0.

- los perfiles de concentración de glucosa, muestran una acumulación inicial instantánea, producto de la acción inmediata de la enzimas (glucoamilasa, α -amilasa y maltasa) sobre el almidón. Esto se debe a que las medidas se llevaron a cabo durante el segundo pulso de almidón en el medio, momento en el cual el sistema enzimático se encuentra mas activo. Ese grado de hidrólisis presenta diferencias según la capacidad tampón del sistema, pues el ensayo BL muestra la menor hidrólisis instantánea y la mayor acumulación de glucosa en el medio en las primeras horas de ensayo, lo que indicaría que el elevado pH (sobre 7,5) podría afectar el proceso de acidificación y/o el mecanismo de ingreso de glucosa a la célula. En las otras dos condiciones de tamponamiento ensayadas, la acumulación de glucosa solo está dada por la acción instantánea del sistema enzimático, ya que en las primeras horas del ensayo su concentración se mantiene aproximadamente constante, para luego empezar a disminuir con la consecuente generación de AGV.

En la Figura 3.12 se comparan las cinéticas de hidrólisis de almidón para las dos temperaturas ensayadas, 15°C para el rango psicrófilo y 37°C para el rango mesófilo de temperatura, considerando la concentración de almidón en forma adimensional, calculada en relación a la concentración inicial del sustrato, con el fin de que los perfiles sean comparables directamente. En ella se observa claramente la influencia de dicho parámetro, obteniéndose velocidades muy inferiores para la temperatura mas baja, aunque el efecto de la capacidad de tamponamiento es similar en ambos casos.

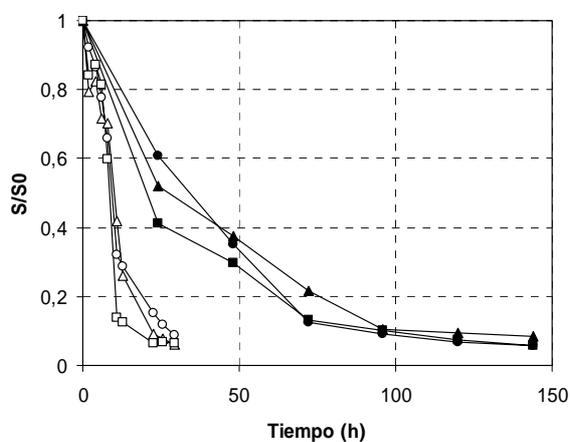


Figura 3.12. Perfil de hidrólisis de almidón en función de la temperatura y la capacidad de tamponamiento utilizada. BL(● 15°C, ○ 37°C): adición de bicarbonato, pH inicial sin ajustar; SB(■ 15°C, □37°C): sin adición de bicarbonato, pH inicial 7,0; CB(▲ 15°C, △ 37°C): adición de bicarbonato, pH inicial 7,0.

Finalmente, se calculó la actividad hidrolítica de cada alternativa de tamponamiento y las dos temperaturas ensayadas, ignorando el grado de hidrólisis inicial alcanzado, obteniéndose los resultados presentados en la Figura 3.13.

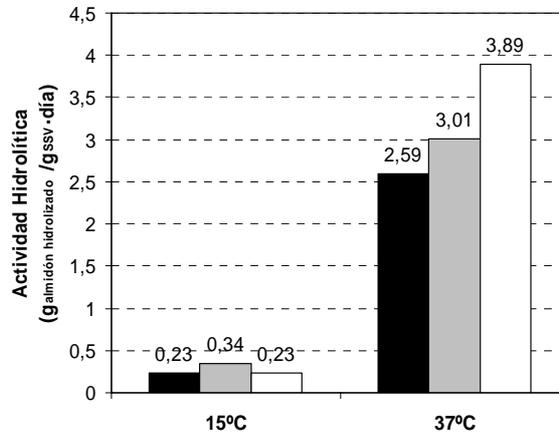


Figura 3.13. Actividad hidrolítica de lodos metanogénicos obtenidas a distintas condiciones de tamponamiento (CB en negro; SB en gris y BL en blanco). Ensayos llevados a cabo a 15 y 37°C.

De acuerdo a lo anterior, y aunque a 37°C se observa que las variaciones en el pH del medio ejercen alguna influencia sobre la velocidad de hidrólisis del almidón, en el rango psicrófilo, 15°C, no resulta tan claro dicho efecto, pues como en este caso la cinética es mas lenta, se enmascaran los efectos observados a 37°C. De esta manera, se decidió llevar a cabo el estudio en reactores operando en continuo, utilizando una relación bicarbonato:almidón de 1:1, para evitar la caída brusca del pH producto de una acumulación excesiva de ácidos grasos volátiles, pero asegurando que la cinética de degradación de almidón no se vería seriamente afectada.

3.4.3 Ensayos en continuo

La operación en continuo tuvo una duración total de 308 días. Durante este tiempo se utilizó una alimentación sintética con la composición indicada en el punto 2.1 utilizando almidón como fuente de carbono. Esta fase de la investigación se llevó a cabo de acuerdo a las etapas indicadas en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Etapas llevadas a cabo durante la operación en continuo.

	Etapa	Periodo de tiempo
<i>Etapa 1</i>	Puesta en marcha	TRH 12 horas: Día 0 a 14
		TRH 6 horas: Día 14 a 137
<i>Etapa 2</i>	Reactor RCTA con reciclo de biomasa	TRH 3 horas: Día 137 a 203
	Idem + ultrafiltro tangencial	TRH 3 horas: Día 203 a 242
<i>Etapa 3</i>	Reactor de lecho ascendente	TRH 3 horas: Día 242 a 302
	Idem + ultrafiltro tangencial	TRH 3 horas: Día 302 a 308

3.4.3.a Puesta en marcha

Como se señala en la Tabla 3.3, la puesta en marcha del sistema en continuo abarcó un periodo prolongado de tiempo, durante el cual la estrategia fue el aumento de la VCO mediante la disminución del TRH, manteniendo constante la concentración de almidón en la alimentación. De esta manera, se buscó la adaptación de la biomasa inoculada a las condiciones de operación, principalmente baja temperatura y alta velocidad de carga orgánica, pero manteniendo eficiencias elevadas de hidrólisis y acidificación. Por otra parte, en esta etapa también se llevó a cabo un ajuste de la cantidad de nitrógeno requerido por el sistema, de manera de minimizar el crecimiento de la biomasa, que causaba importantes problemas operacionales y retrasaba la obtención de estados estacionarios.

El reactor se operó manteniendo una velocidad de agitación constante de 150 a 220 rpm. Un estudio de Distribución de Tiempos de Residencia (DTR) determinó previamente que para esos niveles de agitación el equipo podía ser modelado como reactor de mezcla completa. El caudal de recirculación de la línea proveniente del sedimentador se fijó en una razón de 14:1, en relación con la corriente de alimentación, con el fin de garantizar la devolución de una cantidad importante del lodo depositado en el sedimentador secundario.

La etapa de puesta en marcha del sistema se inició con un TRH de 12 horas, equivalente a una velocidad de carga orgánica (VCO) de $3 \text{ kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$. Se inoculó con aproximadamente 4 g/L de biomasa metanogénica granular con las características descritas en el apartado 3.4.1. La operación con TRH de 12 horas se extendió por dos semanas, con el fin de comprobar el funcionamiento correcto de los equipos y poner a punto la metodología analítica, disminuyendo a continuación el TRH a 6 horas ($\text{VCO}: 6 \text{ kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$). En esta etapa, a partir del día 42, se ajustó el contenido de nitrógeno en la corriente de alimentación con el fin de limitar el crecimiento de la biomasa. De esta manera, en la formulación inicial se consideraba una relación DQO:N:P de 250:5:1, que se modificó en esta etapa a 700:5:1. Esta relación ha sido planteada para los casos en los que se requiere operar con elevadas concentraciones de biomasa dentro del reactor (Speece, 1996). El efecto de este cambio se ve claramente en la Figura 3.14, que describe la variación del contenido de nitrógeno en la corriente de salida del sistema y de la concentración de sólidos suspendidos, representativo de la biomasa. Como se observa, esta última se estabiliza aproximadamente en 15 g/L al cabo de 75 días de operación.

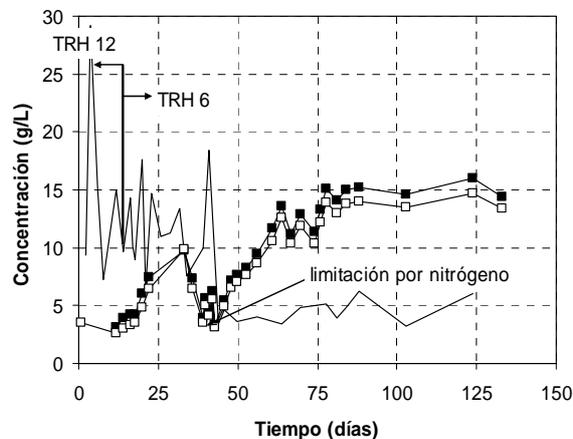


Figura 3.14. Variación del contenido de NTK en efluente del reactor (línea continua), SST (■) y SSV (□) durante el periodo de puesta en marcha, para la operación con TRH de 12 y 6 horas.

El comportamiento del reactor en esta etapa de la operación se resume en la Tabla 3.4, donde se muestra que la degradación de almidón casi no se vio afectada con

los cambios aplicados, aunque no así el grado de acidificación que aumenta hasta cerca de un 80%, o la distribución de ácidos grasos volátiles (AGV) en donde se produce un aumento continuo del contenido de propionato y la disminución del contenido de butirato. Esta relación opuesta ya fue reportada por Cohen *et al.* (1984) en experimentos de acidificación de glucosa, sacarosa y almidón realizados a 30°C.

Tabla 3.4. Resumen de resultados obtenidos para la etapa de puesta en marcha. Operación con TRH de 6 y 12 h.

	TRH 12 h	TRH 6 h	
		SLN ¹	CLN ²
Degradación almidón (%)	99	98,4	
Acidificación ³ (%)	36,1	52,9	77,2
	Acetato	40,9	30,4
Comp. AGV ⁴ (%)	Propionato	16,2	53,8
	Butirato	42,9	15,8

Nota (1) SLN: sin limitación por nitrógeno; (2) CLN: con limitación por nitrógeno; (3) calculada como porcentaje de DQO_{alimentado} convertido a AGV; (4) calculada a partir del DQO de cada fracción.

En la Figura 3.15 se muestra la composición de la corriente de salida para la operación con TRH de 6 horas. Este análisis se realizó a partir de un balance de DQO en el que se determinó que los componentes considerados aportan entre un 93 y 100% del DQO total de la corriente, de manera que se puede asumir, sin cometer un error importante, que no hay otras especies presentes en concentraciones significativas. Como se observa, la limitación por nitrógeno trajo consigo un incremento importante del contenido en propionato y la disminución de la proporción de acetato, como ya se ha indicado en la Tabla 3.4.

Es importante resaltar que el método utilizado para la determinación analítica del almidón permite cuantificar todos los azúcares que no son azúcares reductores, por lo que un valor distinto de cero no necesariamente se debe a la presencia de moléculas no hidrolizadas, sino que puede originarse por compuestos provenientes de una hidrólisis parcial del almidón, por la acción de la enzima α -amilasa que actúa en el interior de las moléculas liberando principalmente moléculas de maltodextrinas. Las maltodextrinas pueden ser de distinta

complejidad dependiendo de la cantidad de moléculas de glucosa involucradas. Se ha comprobado que las moléculas de maltodextrina de peso molecular de hasta 1152 Da (maltoheptosa) son capaces de ingresar a la célula, para ser metabolizadas, por medio de un sistema de transporte específico llamado maltoporina ubicado en la membrana externa de la célula (Ranquin y Van Gelder, 2004). La glucosa, el otro compuesto obtenido de la degradación de almidón a través de la acción de la glucoamilasa, ingresa a la célula principalmente por medio del mecanismo de difusión facilitada con la ayuda de una proteína transportadora, sistema denominado PET-PTS. El mecanismo acopla la traslocación del compuesto con la fosforilación de manera de que la concentración de glucosa en el citoplasma se mantiene baja favoreciendo la difusión de este compuesto (Postma *et al.*, 1993; Martin, 1994).

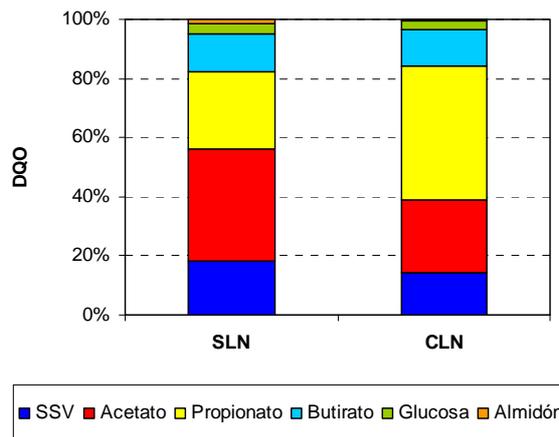


Figura 3.15. Distribución de componentes de la corriente de salida del sistema en la etapa de puesta en marcha. Operación con TRH 6 horas sin (SLN) y con (CLN) limitación por nitrógeno.

Como se planteó en los objetivos, esta investigación pretende obtener un efluente rico en moléculas de bajo peso molecular, solubles, y fácilmente metabolizables en una segunda etapa de tratamiento. De esta manera, se caracterizaron las corrientes de alimentación y salida en función de los tamaños moleculares de sus componentes, empleando la técnica descrita en el apartado 2.2.4. El resultado se muestra en la Figura 3.16. En primer lugar, ya que la corriente de alimentación no

se mantuvo refrigerada, se analizó su máxima degradación, observándose que esta presenta un cierto grado de hidrólisis parcial, pero no de acidificación. El almidón no hidrolizado está representado por la fracción superior a 100 kDa (Sanroman *et al.*, 1996), que disminuye, aumentando consecuentemente la fracción 10-100 kDa, quedando inalterada la fracción menor que 1 kDa que contendría principalmente azúcares reductores, AGV y maltodextrinas de bajo peso molecular. La salida del sistema, operando con TRH de 6 horas, muestra una solubilización (expresada como la fracción menor que 1 kDa) del 55%. Las fracciones 1-10 y 10-100 kDa incluyen fracciones de almidón parcialmente hidrolizados.

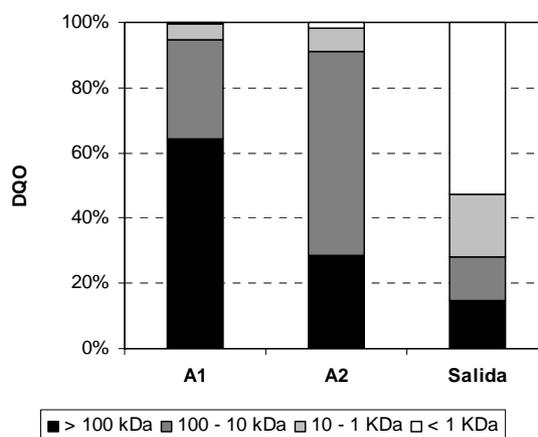


Figura 3.16. Fraccionamiento por tamaños moleculares de las corrientes de alimentación y salida del reactor durante la etapa de puesta en marcha con TRH de 6 h. A1: alimentación fresca; A2: alimentación degradada.

3.4.3.b Reactor de mezcla completa (RCTA)

Esta etapa se llevó a cabo en dos fases y tuvo una duración total de 108 días. La primera fase se extendió por cerca de 2 meses, al cabo de lo cual se acopló un sistema de ultrafiltración tangencial con el fin de evaluar sus beneficios.

Durante este periodo el sistema se operó con un TRH de 3 h, lo que significó el aumento de la carga aplicada desde 6 a 12 $\text{kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$. Esta modificación trajo consigo una leve disminución de la eficiencia de degradación de almidón, estabilizándose en aproximadamente un 95%, en comparación con los valores

cercanos al 100% de la etapa de puesta en marcha. Durante la fase de acoplamiento del sistema de ultrafiltración tangencial el reciclo de la línea de retenido se llevó a cabo paulatinamente, aplicando caudales de 3 – 7 – 21 y 33 mL/min. Los resultados obtenidos para la operación del reactor sin y con ultrafiltro acoplado se resumen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resumen de resultados obtenidos para la operación del reactor RCTA con TRH de 3 h sin y con ultrafiltro acoplado.

	Sin ultrafiltro	Con ultrafiltro ³				
		3	7	21	33	
Degradación almidón (%)	95	100	99	95	95	
Acidificación ¹ (%)	65	67,1	66,2	68,6	68,5	
Comp. AGV ² (%)	Acetato	32,3	35,1	31,0	35,5	29,2
	Propionato	27,7	33,2	35,2	33,9	27,6
	Butirato	40,0	31,6	33,8	32,6	43,1

Nota (1) calculada como porcentaje de DQO_{alimentado} convertido a AGV; (2) calculada a partir del DQO de cada fracción; (3) caudal de retenido recirculado al reactor (mL/min).

Como se observa, inicialmente la operación del sistema con acoplamiento del UF modificó levemente los niveles de acidificación (pasando de un 65% a un 67%, aproximadamente) y la distribución de AGV, principalmente en cuanto al contenido de butirato. Sin embargo, el incremento del caudal de retenido recirculado, desde 3 a 33 mL/min, permitió restablecer la distribución de los AGV, hasta alcanzar valores similares a los obtenidos durante la operación sin el UF. La acidificación se mantuvo cercana al 70% del DQO alimentado, valor similar al alcanzado durante la segunda etapa de la operación con TRH de 6 horas. La composición de la corriente de salida para cada una de las etapas mencionadas (Figura 3.17) muestra la desaparición de la fracción correspondiente a los SSV durante la operación con UF acoplado, ya que esta fracción es retenida por la membrana de 10 kDa, y el aumento de la fracción de almidón en la corriente filtrada producto del incremento del caudal de retenido recirculado al reactor, igualando el valor obtenido en la salida del equipo sin UF.

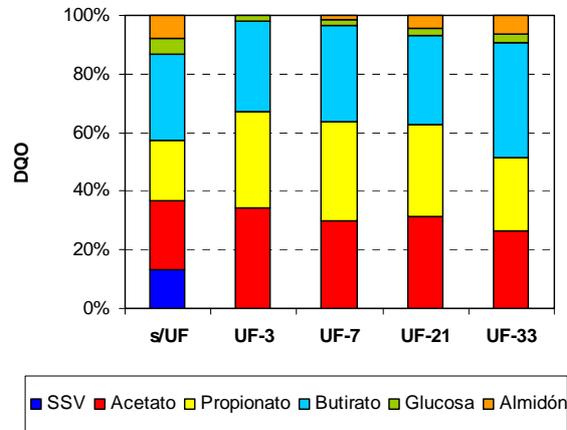


Figura 3.17. Distribución de componentes de la corriente de salida del sistema en la etapa de operación del RCTA con TRH de 3 horas sin (s/UF) y con UF con caudales de recirculación de retenido crecientes (UF-3; UF-7; UF-21; UF-33).

En cuanto a la distribución de tamaños moleculares, la Figura 3.18 presenta la comparación de una “típica” corriente de alimentación con las salidas obtenidas sin y con acoplamiento del UF y además una salida denominada intermedia, correspondiente a la corriente que sale del reactor y se alimenta al ultrafiltro. Los resultados de la operación con UF corresponden a la operación con recirculación de 33 mL/min de retenido.

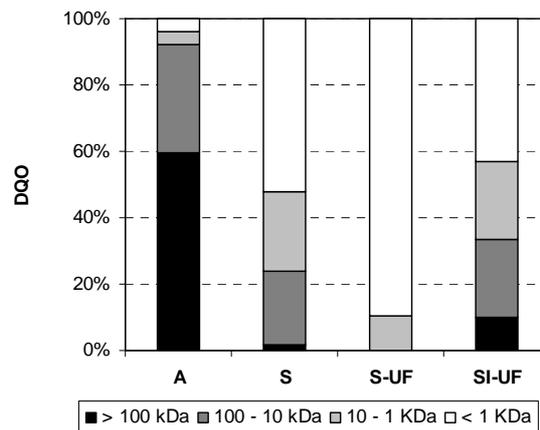


Figura 3.18. Fraccionamiento por tamaños moleculares durante la operación del reactor RCTA con TRH de 3 horas. (A) alimentación; (S) salida sin UF acoplado; (S-UF) salida con UF acoplado; SI-UF salida intermedia con UF acoplado.

Tal como se espera, la salida del sistema de UF presenta aproximadamente un 90% de partículas de tamaño menor que 1 kDa (fracción denominada soluble); esta misma fracción ocupa poco más del 40% de la corriente que sale del reactor (salida intermedia), la cual también presenta una acumulación de componentes de tamaño mayor que 100 kDa, representativos de las moléculas de almidón no hidrolizadas.

La operación del reactor en la modalidad de RCTA se caracterizó por la elevada cantidad de sólidos suspendidos que generalmente sobrepasaban los 100 mg/L con picos de 150 a 200 mg/L producto de la elevada concentración de biomasa en el reactor (15-20 g/L) y su mala sedimentabilidad. Esto ocasionó frecuentes detenciones del sistema de UF producto de la rápida obturación de la membrana.

3.4.3.c Reactor de lecho ascendente

Al igual que para el caso del reactor RCTA (descrito en el punto 3.4.3.b), los ensayos tuvieron dos etapas, sin y con acoplamiento de un sistema de ultrafiltración, con una duración total de 65 días. El TRH se mantuvo en 3 horas. Para la operación de esta configuración de reactor, se disminuyó la agitación al mínimo posible, dado por el equipo utilizado (45 rpm), tratando de minimizar la salida de lodo en el efluente, que obstruía el sistema. De esta manera, se logró modificar la calidad del lodo hidrolítico mejorando su velocidad de sedimentación, disminuyendo en consecuencia la concentración de sólidos suspendidos en el efluente. Esta configuración de reactor recibió el nombre de *Reactor de Lecho Ascendente* pues los lodos se mantenían en la zona inferior del reactor y la alimentación se realizaba por el fondo. En este caso, se mantuvo la recirculación en 14:1, como se mencionó en el apartado 3.4.3.b con el fin de asegurar el adecuado nivel de mezclado en el reactor.

En la primera parte del sistema sin UF se operó duplicando la concentración de almidón en la alimentación durante 15 días (etapa denominada de carga alta), alcanzando una VCO de $24 \text{ kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, para luego regresar a la carga normal de almidón con 1,5 g/L durante los siguientes 30 días. La operación con sobrecarga de almidón también incluyó una fase de stress por limitación por nitrógeno (LPN), en donde la relación DQO/N/P se ajustó a 1300/5/1, con el fin de intentar

controlar el excesivo crecimiento de la biomasa que alcanzó los 40 g_{SSV}/L. El comportamiento del reactor con estas condiciones de operación se describe en la Figura 3.19 para la degradación de almidón y concentración de glucosa y en la Figura 3.20 para la concentración de biomasa.

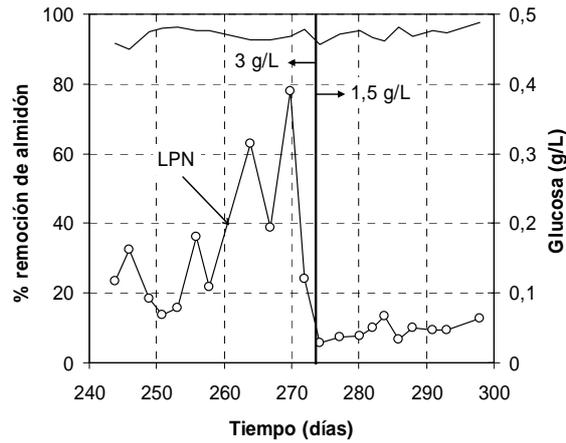


Figura 3.19. Comportamiento del reactor de lecho ascendente para TRH de 3 horas y operación con carga alta y carga normal de almidón. LPN: limitación por nitrógeno. Remoción de almidón (línea continua); concentración de glucosa (○).

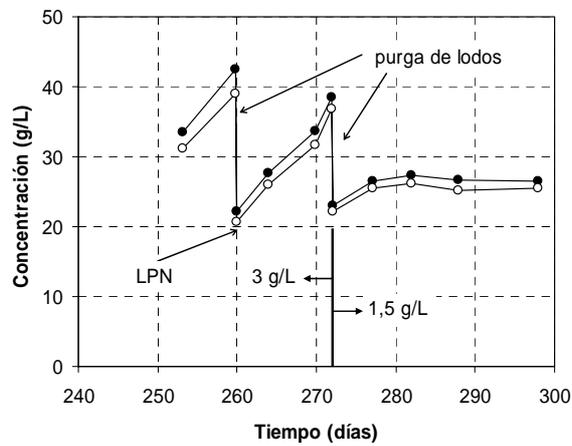


Figura 3.20. Biomasa en el reactor de lecho ascendente para TRH de 3 horas y operación con alta y carga normal de almidón. LPN: limitación por nitrógeno. SST (●); SSV (○).

Como se observa, el nivel de remoción de almidón se mantuvo prácticamente inalterado para las condiciones ensayadas, cercano al 95% con una leve disminución al restringir el aporte de nitrógeno, y similar también a los resultados obtenidos para el RCTA (ver Tabla 3.5). La concentración de glucosa, sin embargo, se vio afectada por la sobrecarga de almidón (operación con carga alta) mostrando una oscilación que fue aun más evidente al restringir el nitrógeno alimentado, si bien hacia el final de la operación recuperó los valores normales obtenidos en la etapa con carga normal de almidón. Este comportamiento no pudo ser validado debido a que la inestabilidad del reactor, producto de la elevada concentración de biomasa, obligó el restablecimiento de la carga normal de almidón (1,5 g/L), en el día 270 de operación. Para esta condición el reactor operó establemente alcanzando una concentración de biomasa cercana a 28 g_{SSV}/L, pudiendo acoplarse, al cabo de 30 días de operación, el sistema de ultrafiltración tangencial, lográndose la degradación completa del almidón y un elevado porcentaje de acidificación, pero manteniendo la distribución de AGV obtenida previamente.

El resumen de resultados obtenidos para la operación del reactor de lecho ascendente sin y con UF se presenta en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Resumen de resultados obtenidos para la operación del reactor de lecho ascendente con TRH de 3 h, sin y con ultrafiltro acoplado.

	Sin ultrafiltro			Con ultrafiltro ³	
	VCO 24		VCO 12		
	--	LPN			
Degradación almidón (%)	95	93	95	99,7	
Acidificación ¹ (%)	68,3	75,1	78,4	89,0	
Comp. AGV ² (%)	Acetato	29,3	32,0	32,0	36,7
	Propionato	29,5	18,7	14,8	16,6
	Butirato	41,1	49,3	53,2	46,6

Nota (1) calculada como porcentaje de DQO_{alimentado} convertido a AGV; (2) calculada a partir del DQO de cada fracción; (3) caudal de retenido recirculado al reactor 33 mL/min.

De los resultados presentados resalta el hecho de que a pesar de que el grado de hidrólisis se mantiene inalterado, como ya se había mencionado, la etapa de acidificación es sensible a las variaciones implementadas en la operación del

reactor, alcanzando el 75% acidificación para la fase de stress por deficiencia de nitrógeno y carga alta de almidón y un 90% para la fase de acoplamiento del UF con carga normal de almidón. La operación con VCO de 12, equivalente a la presentada en la Tabla 3.5 para la operación del reactor en la modalidad de RCTA, permitió alcanzar un grado de acidificación mayor, aunque similar al obtenido para la operación TRH de 6 horas y con limitación por nitrógeno (ver Tabla 3.4). Por otro lado, la distribución de AGV también varía constantemente, con la excepción del contenido de acetato que se estabiliza en un 30% de la DQO debido a AGV, siendo incluso distinta a la obtenida durante la operación del reactor como RCTA con la misma carga de almidón, TRH y nitrógeno alimentado (ver Tabla 3.5). La Figura 3.21 muestra la composición de la corriente de salida para cada etapa mencionada, en donde se observa la desaparición de la fracción correspondiente al almidón y a la biomasa, debida al acoplamiento del UF.

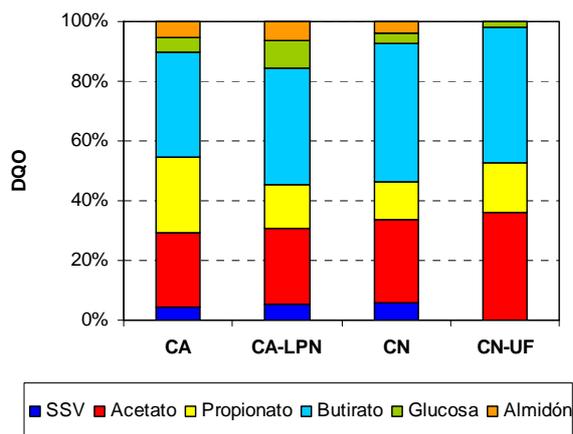


Figura 3.21. Distribución de componentes de la corriente de salida del sistema en la etapa de operación del reactor de lecho ascendente con TRH de 3 horas sin UF y con UF.

CA: 3 g_{almidón}/L; CA-LPN: 3 g_{almidón}/L y limitación por nitrógeno; CN: 1,5 g_{almidón}/L; CN-UF: 1,5 g_{almidón}/L y caudal de recirculación de retenido de 33 mL/min.

En cuanto a la distribución de tamaños moleculares, la Figura 3.22 presenta la comparación de una corriente de alimentación ejemplo con las salidas obtenidas sin acoplamiento del UF para alta y baja carga de almidón. No se realizó el fraccionamiento para la operación con UF acoplado pues se obtuvo cerca de un

100% de degradación de almidón. Como se observa, el comportamiento observado es similar al obtenido para la operación del RCTA (ver Figura 3.18), sin embargo el reactor es capaz de operar con VCO de $24 \text{ kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$ con una pequeña acumulación de la fracción superior a 100 kDa, pero manteniendo una solubilización cercana al 60%.

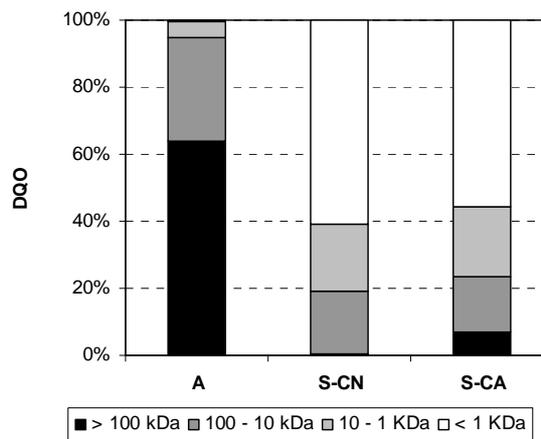


Figura 3.22. Fraccionamiento por tamaños moleculares durante la operación del reactor de lecho ascendente con TRH de 3 horas. (A) alimentación; (S-CN) salida operación con $1,5 \text{ g}_{\text{almidón}}/\text{L}$; (S-CA) operación con $3 \text{ g}_{\text{almidón}}/\text{L}$.

3.4.3.d Discusión integrada

Como se ha visto, las diferentes configuraciones implementadas permitieron la mejora del comportamiento de los reactores en cuanto a estabilidad de operación, llegando a obtenerse, para la carga normal de almidón, cerca de un 100% de hidrólisis del almidón, con un 90% de acidificación de la DQO alimentada con el acoplamiento del sistema de UF para el reactor de lecho ascendente. La integración de los resultados obtenidos para el grado de acidificación, distribución de AGV y porcentaje de hidrólisis se presenta en la Figura 3.23, considerando la siguiente nomenclatura en relación a las configuraciones ensayadas.

-
- A** TRH 12 h en reactor RCTA; C:N:P 250:5:1
 - B** TRH 6 h en reactor RCTA; DQO:N:P 250:5:1
 - C** TRH 6 h – RCTA – limitación nitrógeno; DQO:N:P 700:5:1
 - D** TRH 3 h – reactor RCTA; DQO:N:P 700:5:1
 - E** TRH 3 h – reactor RCTA – UF acoplado; DQO:N:P 700:5:1
 - F** TRH 3 h – reactor lecho ascendente (LA) – alta carga de almidón (AC);
DQO:N:P 700:5:1
 - G** TRH 3 h – LA –AC; DQO:N:P 1300:5:1
 - H** TRH 3 h – LA – carga normal de almidón; DQO:N:P 700:5:1
 - I** TRH 3 h – LA – carga normal de almidón – UF acoplado; DQO:N:P
700:5:1
-

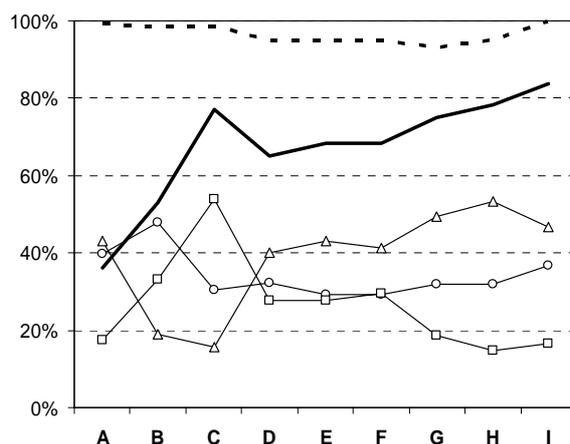


Figura 3.23. Comportamiento de las distintas configuraciones ensayadas para el proceso de hidrólisis/acidogénesis anaerobia de almidón a 15°C. Símbolos: Porcentaje de hidrólisis (---) y porcentaje de acidificación (—). Distribución de AGV en porcentaje de DQO: acetato (○); propionato (□); butirato (Δ).

En la figura se aprecia que la operación con carga elevada de almidón (F) no afectó el comportamiento del reactor, no así el posterior stress por deficiencia de nitrógeno (G) que provocó el incremento del grado de acidificación y la disminución sostenida del propionato, de manera tal que hacia el final de la operación del reactor, la distribución de AGV es semejante a la obtenida con TRH

de 12 horas, pero duplicando la acidificación, lo que podría deberse a que en las etapas iniciales de operación se produjo metanización y hacia el final de la investigación no. La variación del TRH de 12 a 6 horas, y luego el stress por nitrógeno con TRH de 6 horas (C), ocasionó el efecto contrario, aumentando bruscamente el contenido de propionato en la salida del sistema con la consiguiente disminución del butirato. Como se mencionó anteriormente, la relación opuesta entre el contenido de butirato y propionato ya había sido reportada por Cohen *et al.* (1984). Los mismos autores establecen una relación directa entre la concentración de butirato y la presión de hidrógeno, de manera que en presencia de una alta presión de este gas, debería haber una baja concentración de propionato. Esta observación es avalada por estudios realizados por Mosey y Fernández (1989) que sugieren que la distribución de AGV producidos a partir de la degradación de carbohidratos podría estar controlada por dinámicas poblacionales. De esta manera, vieron que en una operación normal la presión de hidrógeno se mantiene baja predominando microorganismos del tipo *propionibacteria* y *enterobacteriaceae*, que no se ven afectados por la presión parcial de hidrógeno y que producen principalmente propionato, acetato y formato en proporciones fijas, observando una baja concentración de butirato. En presencia de una sobrecarga de carbono y cuando la actividad de las bacterias responsables del consumo de hidrógeno es limitada o suprimida, se produce el rápido aumento de la presión parcial de hidrógeno y la acumulación de butirato, esperándose cantidades equimolares de acetato y propionato. El desbalance entre esas proporciones estaría dado por la acción de la población de *Syntrophobacter wolinii*, responsable de la transformación de propionato en acetato o de *Syntrophomona wolfei*, capaz de producir acetato a partir de butirato. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos, pues desde la operación D en adelante, la mezcla de AGV fue rica en butirato, correspondiendo a una operación sobrecargada en almidón. Las variaciones encontradas en las proporciones de butirato y propionato, al mantenerse aproximadamente constante el aporte de acetato, podría deberse a la ya conocida reacción de carboxilación reductiva de propionato a butirato (Tholozan *et al.*, 1988) o la reacción inversa que también ha sido reportada (Gourdon *et al.*, 1988).

3.4.3.e Caracterización de la biomasa

La biomasa desarrollada al cabo de los 308 días de operación en continuo del reactor en sus diferentes configuraciones, fue caracterizada de acuerdo a los parámetros de actividad hidrolítica, acidogénica y metanogénica. Los resultados se presentan en la Figura 3.24, en donde se incluyen, con fines comparativos, los datos presentados en la Figura 3.8 para la biomasa utilizada como inóculo. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 15°C.

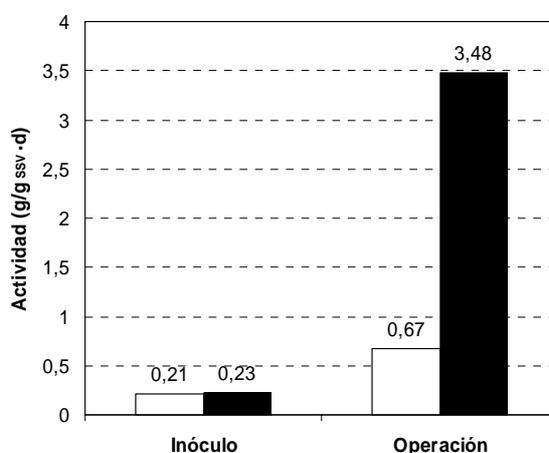


Figura 3.24. Caracterización del lodo anaerobio utilizado como inóculo y adaptado a la degradación de almidón a 15°C tras 308 días de operación, en relación a los valores de actividad acidogénica (blanco) y actividad hidrolítica (negro).

El ensayo de actividad metanogénica arrojó un valor de cero, debido a que el reactor operó en condiciones hidrolíticas, con TRS promedio de 25 días, lo que ocasionó el lavado de biomasa metanogénica. Ya que el tiempo de duplicación de las bacterias metanogénicas ha sido estimado en el rango de 2 a 11 días en condiciones convencionales de operación, se estima que se requiere un mínimo de 3 a 16 días de TRS para tener una metanogénesis adecuada, aunque en la práctica para un adecuado desarrollo de esta flora microbiana se utilizan TRS de 10 a 30 días (Ghosh y Pohland, 1974). Se ha reportado que a 25°C se requiere un TRS de 10 días para que ocurra metanización, mientras que a 15°C se necesita operar con al menos 75 días de TRS (Zeeman y Sanders, 2001). La ausencia de metanización se ratificó, paralelamente, por medio del análisis de la composición de la fase

gaseosa, que reportó solo trazas de metano, y a través del balance de DQO que determinó que el efluente contenía al menos el 80% del DQO alimentado.

Como se observa, los valores de actividad acidogénica e hidrolítica se vieron incrementados tras aproximadamente un año de operación, pero en proporciones distintas. La primera, aproximadamente 3,2 veces y la segunda 15 veces. Estos incrementos permiten concluir que la biomasa es capaz de hidrolizar eficientemente una molécula compleja de peso molecular elevado, como es el caso del almidón, a velocidades altas, en concentraciones relativamente elevadas, TRH cortos y operando a baja temperatura, lo que permite tratar caudales elevados de efluentes con cargas importantes de carbohidratos, obteniendo un efluente rico en sustancias solubles (principalmente una mezcla de AGV).

3.5 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se concluye que es posible operar a VCO elevadas ($24 \text{ g}_{\text{almidón}}/\text{L}_{\text{reactor}}\cdot\text{día}$), con TRH de 3 horas y 3 g/L de almidón manteniendo una eficiencia de degradación superior al 93%.

La biomasa desarrollada ha aumentado su actividad hidrolítica en aproximadamente 15 veces, en relación al inóculo original, mientras que la actividad acidogénica solo se incrementa en un factor de 3. A pesar de ello, la fase hidrolítica sigue siendo la limitante para las condiciones ensayadas, ya que para el escenario más extremo de operación no se produjo una acumulación importante de azúcares reductores, obteniéndose un efluente con al menos el 67% del DQO en forma de AGV. Esto hace pensar que aún es posible aumentar la VCO de operación, con el fin de encontrar el límite de operación.

En comparación con la operación del reactor RCTA con reciclo de biomasa, la configuración de lecho ascendente resultó ser más eficiente, al haber desarrollado biomasa de mejor sedimentabilidad, permitiendo alcanzar la mayor VCO de operación y los mejores porcentajes de degradación y acidificación. La distribución de tamaño molecular es similar en ambas configuraciones, aunque mediante el reactor de lecho ascendente el porcentaje de solubilización aumenta del 50 a 60 % (fracción inferior a 1 kDa), hidrolizando completamente la fracción superior a 100 kDa.

El acoplamiento de un equipo de ultrafiltración tangencial, mejora el comportamiento del proceso de degradación, alcanzando un 95% de hidrólisis y 70% de acidificación en el caso la operación con el reactor RCTA y ~ 100% de hidrólisis y 90% de acidificación con el lecho ascendente. En ambos casos, el efluente resultante es fácilmente biodegradable con un contenido elevado en moléculas de bajo peso molecular, menor que 1 kDa.

3.6 Referencias

- Banerjee,A., Elefsiniotis,P. and Tuhtar,D. (1998) Effect of HRT and temperature on the acidogenesis of municipal primary sludge and industrial wastewater. *Water Science and Technology*, **38** (8-9), 417-423.
- Barker,D.J. and Stuckey,D.C. (2001) Modeling of soluble microbial products in anaerobic digestion: The effect of feed strength and composition. *Water Environment Research*, **73** (2), 173-184.
- Bodik,I., Herdova,B. and Drtil,M. (2000) Anaerobic treatment of the municipal wastewater under psychrophilic conditions. *Bioprocess Engineering*, **22** (5), 385-390.
- Brindle,K. and Stephenson,T. (1996) The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, **49** (6), 601-610.
- Chu,L.B., Yang,F.L. and Zhang,X.W. (2005) Anaerobic treatment of domestic wastewater in a membrane-coupled expanded granular sludge bed (EGSB) reactor under moderate to low temperature. *Process Biochemistry*, **40** (3-4), 1063-1070.
- Chyi,Y.T. and Dague,R.R. (1994) Effects of particulate size in anaerobic acidogenesis using cellulose as a sole carbon source. *Water Environment Research*, **66** (5), 670-678.
- Chyi,Y.T. and Levine,A.D. (1992) Solubilization of particulate cellulose using anaerobic acidogenesis. *Water Science and Technology*, **26** (9-11), 2421-2424.
- Cohen,A., Van Gemert,J.M., Zoetemeyer,R.J. and Breure,A.M. (1984) Main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrates containing wastewater. *Process Biochemistry*, **19** (6), 228-232.
- Confer,D.R. and Logan,B.E. (1997) Molecular weight distribution of hydrolysis products during the biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures .2. Dextran and dextrin. *Water Research*, **31** (9), 2137-2145.
- Eastman,J.A. and Ferguson,J.F. (1981) Solubilization of particulate organic-carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *Journal Water Pollution Control Federation*, **53** (3), 352-366.
- Elmitwalli,T., Zeeman,G. and Lettinga,G. (2001) Anaerobic treatment of domestic sewage at low temperature. *Water Science and Technology*, **44** (4), 33-40.

- Fakhru'l-Razi, A. (1994) Ultrafiltration membrane separation for anaerobic wastewater treatment. *Water Science and Technology*, **30** (12), 321-327.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K. and Li, Y.Y. (1995) Effect of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules. *Water Science and Technology*, **32** (8), 165-172.
- Fang, H.H.P. and Kwong, T.S. (1994) Degradation of starch particulates in a hybrid reactor. *Water Science and Technology*, **30** (4), 97-104.
- Ferreiro, N. and Soto, M. (2003) Anaerobic hydrolysis of primary sludge: influence of sludge concentration and temperature. *Water Science and Technology*, **47** (12), 239-246.
- Field, J.A. (2002) Limits of anaerobic biodegradation. *Water Science and Technology*, **45** (10), 9-18.
- Fox, P. and Pohland, F.G. (1994) Anaerobic treatment applications and fundamentals - substrate-specificity during phase-separation. *Water Environment Research*, **66** (5), 716-724.
- Ghosh, S. and Pohland, F.G. (1974) Kinetics of substrate assimilation and product formation in anaerobic digestion. *Journal Water Pollution Control Federation*, **46** (4), 748-759.
- Gonçalves, R.F., Charlier, A.C. and Sammut, F. (1994) Primary fermentation of soluble and particulate organic-matter for wastewater treatment. *Water Science and Technology*, **30** (6), 53-62.
- Gourdon, R., Comel, C., Vermande, P. and Veron, J. (1988) N-butyrate catabolism in the treatment of a semi-synthetic landfill leachate on anaerobic filter under sequential feeding conditions. *Biomass*, **15** (1), 11-24.
- Halalsheh, M., Sawajneh, Z., Zu'bi, M., Zeeman, G., Lier, J., Fayyad, M. and Lettinga, G. (2005) Treatment of strong domestic sewage in a 96 m³ UASB reactor operated at ambient temperatures: two-stage versus single-stage reactor. *Bioresource Technology*, **96** (5), 577-585.
- Harada, H., Momonoi, K., Yamazaki, S. and Takizawa, S. (1994) Application of anaerobic-UF membrane reactor for treatment of a wastewater containing high-strength particulate organics. *Water Science and Technology*, **30** (12), 307-319.
- Inanc, B., Matsui, S. and Ide, S. (1999) Propionic acid accumulation in anaerobic digestion of carbohydrates: An investigation on the role of hydrogen gas. *Water Science and Technology*, **40** (1), 93-100.
- Jeyaseelan, S. and Matsuo, T. (1995) Effects of phase-separation in anaerobic digestion on different substrates. *Water Science and Technology*, **31** (9), 153-162.
- Kalyuzhnyi, S.V., Gladchenko, M.A., Sklyar, V.I., Kizimenko, Y.S. and Shcherbakov, S.S. (2001) Psychrophilic one- and two-step systems for pretreatment of winery waste water. *Water Science and Technology*, **44** (4), 23-31.

- Lay, J.J. (2000) Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, **68** (3), 269-278.
- Lettinga, G., Rebac, S., Parshina, S., Nozhevnikova, A., van Lier, J.B. and Stams, A.J. (1999) High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (4), 1696-1702.
- Lettinga, G., Rebac, S. and Zeeman, G. (2001) Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, **19** (9), 363-370.
- Ligero, P., de Vega, A. and Soto, M. (2001) Influence of HRT (hydraulic retention time) and SRT (solid retention time) on the hydrolytic pre-treatment of urban wastewater. *Water Science and Technology*, **44** (4), 7-14.
- Maharaj, I. and Elefsiniotis, P. (2001) The role of HRT and low temperature on the acid-phase anaerobic digestion of municipal and industrial wastewaters. *Bioresource Technology*, **76** (3), 191-197.
- Mahmoud, N., Zeeman, G., Gijzen, H. and Lettinga, G. (2004a) Anaerobic sewage treatment in a one-stage UASB reactor and a combined UASB-Digester system. *Water Research*, **38** (9), 2348-2358.
- Mahmoud, N., Zeeman, G., Gijzen, H. and Lettinga, G. (2004b) Anaerobic stabilisation and conversion of biopolymers in primary sludge - effect of temperature and sludge retention time. *Water Research*, **38** (4), 983-991.
- Marrot, B., Barrios-Martinez, A., Moulin, P. and Roche, N. (2004) Industrial wastewater treatment in a membrane bioreactor: A review. *Environmental Progress*, **23** (1), 59-68.
- Martin, S.A. (1994) Nutrient Transport by Ruminant Bacteria - A Review. *Journal of Animal Science*, **72** (11), 3019-3031.
- Mino, T., Sanpedro, D.C. and Matsuo, T. (1995) Estimation of the rate of slowly biodegradable COD (SBCOD) hydrolysis under anaerobic, anoxic and aerobic conditions by experiments using starch as model substrate. *Water Science and Technology*, **31** (2), 95-103.
- Miron, Y., Zeeman, G., Van Lier, J.B. and Lettinga, G. (2000) The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Research*, **34** (5), 1705-1713.
- Mosey, F.E. and Fernandes, X.A. (1989) Patterns of hydrogen in biogas from the anaerobic-digestion of milk-sugars. *Water Science and Technology*, **21** (4-5), 187-196.
- Mulder, R., Vereijken, T.L.F.M., Frijters, C.T.M.J. and Vellinga, S.H.J. (2001) Future perspectives in bioreactor development. *Water Science and Technology*, **44** (8), 27-32.
- Perot, C. and Amar, D. (1989) Optimization of sludge anaerobic-digestion by separation of hydrolysis-acidification and methanogenesis. *Environmental Technology Letters*, **10** (7), 633-644.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate - carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*, **57** (3), 543-594.

- Ranquin,A. and Van Gelder,P. (2004) Maltoporin: sugar for physics and biology. *Research in Microbiology*, **155** (8), 611-616.
- Rebac,S., van Lier,J.B., Lens,P., van Cappellen,J., Vermeulen,M., Stams,A.J.M., Dekkers,F., Swinkels,K.T.M. and Lettinga,G. (1998) Psychrophilic (6-15 °C) high-rate anaerobic treatment of malting wastewater in a two-module expanded granular sludge bed system. *Biotechnology Progress*, **14** (6), 856-864.
- Sanders,W.T.M., Geerink,M., Zeeman,G. and Lettinga,G. (2000) Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates. *Water Science and Technology*, **41** (3), 17-24.
- Sanroman,A., Murado,M.A. and Lema,J.M. (1996) The influence of substrate structure on the kinetics of the hydrolysis of starch by glucoamylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **59** (3), 329-336.
- Schink,B. (2002) Anaerobic digestion: concepts, limits and perspectives. *Water Science and Technology*, **45** (10), 1-8.
- Speece,R.E. (1996) *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater*. Archae Press, Nashville, TN.
- Tholozan,J.L., Samain,E., Grivet,J.P., Moletta,R., Dubourguier,H.C. and Albagnac,G. (1988) Reductive carboxylation of propionate to butyrate in methanogenic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, **54** (2), 441-445.
- Ubukata,Y. (1999) Kinetics and fundamental mechanisms of starch removal by activated sludge: Hydrolysis of starch to maltose and maltotriose is the rate-determining step. *Water Science and Technology*, **40** (1), 61-68.
- Uemura,S. and Harada,H. (2000) Treatment of sewage by a UASB reactor under moderate to low temperature conditions. *Bioresource Technology*, **72** (3), 275-282.
- Ueno,Y., Haruta,S., Ishii,M. and Igarashi,Y. (2001) Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57** (1-2), 65-73.
- van der Maarel,M.J.E.C., van der Veen,B., Uitdehaag,J.C.M., Leemhuis,H. and Dijkhuizen,L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology*, **94** (2), 137-155.
- Yu,H.Q., Zheng,X.J., Hu,Z.H. and Gu,G.W. (2003) High-rate anaerobic hydrolysis and acidogenesis of sewage sludge in a modified upflow reactor. *Water Science and Technology*, **48** (4), 69-75.
- Zeeman,G. and Sanders,W. (2001) Potential of anaerobic digestion of complex waste(water). *Water Science and Technology*, **44** (8), 115-122.
- Zhang,T.C. and Noike,T. (1991) Comparison of one-phase and two-phase anaerobic-digestion processes in characteristics of substrate degradation and bacterial population-levels. *Water Science and Technology*, **23** (7-9), 1157-1166.

CAPÍTULO CUARTO

Influencia del contenido de nutrientes en el proceso de hidrólisis/acidogénesis de almidón

RESUMEN

En este capítulo se estudia el proceso de hidrólisis-acidogénesis psicrófila de almidón soluble, como molécula modelo representativa de carbohidratos, considerando el efecto de las limitaciones nutricionales, especialmente en relación a la disponibilidad de nitrógeno. Para ello, se operó un reactor de lecho ascendente operado a TRH de 6 y 3 horas, definiéndose diferentes condiciones nutricionales: la primera con 1,5 g/L de almidón y 12 mg/L de nitrógeno, equivalente a una DQO/N de 700/5, denominada de referencia; y otras cuatro con cantidades variables de carbono y nitrógeno. Adicionalmente, se incorporó calcio en la alimentación para mejorar la sedimentabilidad de la biomasa. Los resultados muestran que la eficiencia de hidrólisis del proceso está condicionada por la concentración de nitrógeno más que por la relación DQO/N, no resultando evidente la influencia de este factor en la etapa de acidificación del sustrato. Así, el efluente obtenido de la operación con una VCO de $24 \text{ kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ y TRH de 3 h contiene cerca de un 60% de moléculas de tamaño inferior a 1 kDa si el nitrógeno alimentado corresponde al de referencia, valor que disminuye al 45% si hay déficit de este nutriente. Cuando se incrementa el TRH hasta 6 horas (VCO de $12 \text{ kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$), no se obtiene mejora alguna en la operación con limitación por nitrógeno, aunque si mejora notablemente al operar en condiciones de suficiencia de nitrógeno, aumentando hasta el 70% el contenido de moléculas de tamaño menor que 1 kDa.

La biomasa desarrollada en los experimentos llevados a cabo incrementa notablemente su capacidad hidrolítica, 56 veces en relación al inóculo metanogénico, mientras que la actividad acidogénica se cuadruplica.

INDICE

4.1	INTRODUCCIÓN	4-3
4.2	OBJETIVOS	4-7
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS	4-7
4.3.1	<i>Ensayos en continuo</i>	4-7
4.3.2	<i>Ensayos en discontinuo</i>	4-8
4.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4-9
4.4.1	<i>Operación en continuo</i>	4-9
4.4.2	<i>Ensayos en discontinuo</i>	4-15
4.4.3	<i>Caracterización de la biomasa</i>	4-17
4.5	CONCLUSIONES	4-18
4.6	REFERENCIAS	4-19

4.1 Introducción

Los procesos biológicos de degradación de materia orgánica se sustentan en la actividad microbiana, por lo que resulta imprescindible considerar los procesos metabólicos de las poblaciones bacterianas involucradas.

Desde el punto de vista nutricional, las células requieren cantidades apropiadas de macronutrientes y micronutrientes (elementos trazas y vitaminas) para desarrollar adecuadamente sus procesos metabólicos de catabolismo y anabolismo. Los microorganismos requieren seis macronutrientes: carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno, hidrógeno y azufre, considerándose los tres primeros como nutrientes primarios. Los elementos traza requeridos incluyen manganeso, zinc, cobalto, molibdeno, níquel, cobre, vanadio, boro; y las vitaminas son K, B₁, B₂, B₆, B₁₂, biotina, niacina y ácido pantoténico (Burgess *et al.*, 1999).

En términos generales, cuando las poblaciones microbianas se encuentran en un medio con condiciones ambientales y nutricionales adecuadas son capaces de generar la energía necesaria para sustentar su desarrollo. De manera que, cuando los microorganismos están limitados por la fuente de energía (generalmente carbono), el catabolismo se acopla fuertemente al anabolismo, obteniéndose altos rendimientos de carbono en biomasa (Russell y Cook, 1995). Sin embargo, cuando se modifican sus condiciones medioambientales (temperatura, pH, presión osmótica, nutrientes, etc), las células bacterianas deben modificar su comportamiento, disponiendo para ello de una variedad de mecanismos. Así, las bacterias pueden acomodar el crecimiento con limitación de nutrientes ajustando o redireccionando rutas metabólicas con el fin de evitar una perturbación estructural o metabólica causada por alguna limitación nutricional específica.

Estudios llevados a cabo con *E. coli* mostraron que, en presencia de limitación por nutrientes (carbono o nitrógeno), este microorganismo controla la permeabilidad de su membrana por medio de la regulación de la expresión de un determinado tipo de porina (Liu y Ferenci, 1998).

Otro efecto ocasionado por la presencia limitada de nutrientes, es el ajuste de los niveles de macromoléculas autocatalíticas (RNA y proteínas) con el fin de aproximar las demandas energéticas al crecimiento celular (Konopka, 2000).

Estudios realizados con *Klebsiella aerogenes* mostraron que el contenido de RNA disminuye notablemente en condiciones limitantes de nitrógeno, aumentando en la fase de limitación por glucosa. La limitación por nitrógeno trae consigo también la disminución del contenido de polisacáridos de la célula conforme aumenta la velocidad de crecimiento del microorganismo al variar la velocidad de dilución (Mulder *et al.*, 1988). Conclusiones similares se obtuvieron en experimentos llevados a cabo con *Enterobacter aerogenes* (Cooney *et al.*, 1976), demostrándose que el contenido celular de polisacáridos está modulado por la razón C/N de la corriente de alimentación.

Cuando la fuente de carbono está en exceso, generalmente hay deficiencia en la fuente de otros nutrientes como el nitrógeno, fósforo o potasio, el catión intracelular más abundante. Mientras que la limitación por fósforo o potasio usualmente involucra el fuerte desacoplamiento de los procesos de catabolismo y anabolismo, alcanzándose bajos rendimientos de biomasa, en el caso del nitrógeno los efectos en la fisiología microbiana son más moderados, aunque en todos los casos disminuye la velocidad de crecimiento (Cooney *et al.*, 1976; Dauner *et al.*, 2001). En los sistemas desacoplados, la energía producida (generalmente a partir de la fuente de carbono) es mayor que la requerida por la célula para los procesos de síntesis y mantenimiento (Russell y Cook, 1995), resultando que el crecimiento celular se ve limitado por la disponibilidad de los nutrientes requeridos para la biosíntesis. Comúnmente se ha observado que los microorganismos que se encuentran en esta situación utilizan vías alternativas para eliminar la energía en exceso (Guedon *et al.*, 2000; Dauner *et al.*, 2001). En la Tabla 4.1 se resumen los posibles efectos derivados de las distintas alternativas de limitaciones nutricionales.

Al analizar los nutrientes denominados primarios, además del carbono, se ha visto que el amonio es la fuente de nitrógeno preferida por las bacterias, en la mayor parte de los casos, y la que permite alcanzar la mayor velocidad de crecimiento bacteriano. El proceso de fijación de amonio por la célula, en la mayoría de las especies microbianas, involucra dos compuestos intermedios (glutamina y glutamato), principalmente a través de dos reacciones enzimáticas (Merrick y Edwards, 1995). En bacterias entéricas, la falta de amonio es percibida por la

célula disminuyendo la concentración interna de glutamina, (Zimmer *et al.*, 2000), mientras que el nivel de glutamato se mantiene inalterado, descendiendo de esta manera la velocidad de crecimiento de la población. En términos generales, cuando el amonio se encuentra en concentraciones altas ingresa a la célula principalmente por el mecanismo de difusión, mientras que en cantidades limitadas las bacterias utilizan un mecanismo activo de transporte, que en una gran variedad de microorganismos se ha identificado como antiporter K^+/NH_4^+ (Russell y Cook, 1995; Merrick y Edwards, 1995).

Tabla 4.1. Posibles efectos ocasionados por la limitación de nutrientes (Cooney *et al.*, 1976).

Nutriente limitante	Acción
Carbono – energía	Disminución de la fuente de carbono para biosíntesis o energía
Nitrógeno o azufre	Inhibición de la síntesis de proteína
Fósforo	Reducción en la síntesis de ácidos nucleicos y/o producción de energía
Magnesio o potasio	Reducción en la síntesis de ácidos nucleicos o pared celular y/o estructura de la membrana o permeabilidad

El fósforo se transporta como fosfato a través del mecanismo ABC (*ATP-binding cassette*; sistema que acopla la captación del fósforo a la hidrólisis de ATP) y su regulación ha sido estudiada completamente en *E. coli*, determinándose la existencia de dos transportadores (de alta y baja afinidad) que se activan dependiendo de la cantidad de fosfato disponible. Este elemento ha sido estudiado largamente debido a que es fundamental para la fisiología celular, interviniendo en una gran cantidad de reacciones. La mayoría de los componentes celulares como los ácidos nucleicos, lípidos y azúcares están fosforilados (Torriani, 1990).

Los procesos biológicos aplicados a la degradación de contaminantes necesitan la acción conjunta de distintas especies bacterianas, muchas de las cuales actúan sintróficamente (Novaes, 1986; Burgess *et al.*, 1999; McHugh *et al.*, 2004). En el proceso de lodos activos, en presencia de una adecuada cantidad y variedad de nutrientes se puede lograr una comunidad microbiana balanceada, de bacterias,

hongos, protozoos, rotíferos y nemátodos (Burgess *et al.*, 1999). En procesos anaerobios conviven una gran cantidad de especies bacterianas capaz de llevar a cabo procesos específicos. Dentro de las bacterias fermentativas se tienen especies de la familia de *Streptococcaceae* y *Enterobacteriaceae*, y de los géneros *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Novaes, 1986). Para el desarrollo de la etapa acetogénica suelen encontrarse presente bacterias del tipo *Syntrophomonas sp.* (oxidantes del butirato) y *Syntrophobacter sp.* (oxidantes del propionato) (McCarty y Mosey, 1991), y para la fase metanogénica se han identificado *Metanococcus*, *Metanobacterium*, *Metanosarcina* y *Metanosaeta* (Demirel y Yenigun, 2002). Es claro que las poblaciones microbianas involucradas dependerán del tipo de agua residual tratada y su contenido nutricional, por lo que las respuestas que se pueden obtener en estudios sobre requerimientos nutricionales son más variadas que al experimentar con cultivos puros.

Las investigaciones llevadas a cabo en esta área han cubierto los casos de aguas residuales deficitarias en uno o más nutrientes, como es el caso de los efluentes de la industria de pulpa y papel (Diez *et al.*, 2002; Slade *et al.*, 2004), industria petroquímica (Xu y Obbard, 2004), manufactura de textiles (Freedman *et al.*, 2005) y aguas grises (Jefferson *et al.*, 2001), entre otros. En estos casos, la debilidad nutricional puede provocar el empobrecimiento del cultivo, perdiendo diversidad, permitiendo la sobrevivencia de las especies más eficientes. De esta manera, podría requerirse un mayor TRH para la completa degradación de los contaminantes, complicando la degradación de componentes que requieren la acción de más de una especie bacteriana (Burgess *et al.*, 1999). Desde el punto de vista de los procesos de bioremediación, el aspecto nutricional cobra importancia por la baja disponibilidad de nutrientes en el suelo o en los medios acuáticos (Leahy y Colwell, 1990). También han sido considerados aspectos operacionales vinculados a la escasez de nutrientes, como por ejemplo la aparición de “bulking” (Peng *et al.*, 2003) o la formación de biofilms (Holubar *et al.*, 1999), ambos relacionados con la deficiencia de nitrógeno.

4.2 Objetivos

En el Capítulo 3 se presentó el comportamiento del proceso de almidón en condiciones nutricionales óptimas, ajustándose solamente la cantidad de nitrógeno con el fin de limitar moderadamente el crecimiento de la biomasa. En este capítulo se evalúa la influencia de la concentración de nutrientes con énfasis en el nitrógeno, así como su proporción en relación con el DQO alimentado (razón DQO/N), sobre la eficiencia de hidrólisis/acidogénesis psicrófila de almidón soluble, tomado como molécula ejemplo de carbohidratos.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Ensayos en continuo

El estudio de la influencia de la concentración de nitrógeno así como su proporción en relación al DQO alimentado, se realizó en el reactor descrito en el punto 3.3.2.a, con la configuración de lecho ascendente, operado a 15°C. En la Figura 3.24 se presentaron las características del lodo utilizado como inóculo, correspondiente al lodo obtenido de la operación descrita en el Capítulo 3.

En la Tabla 4.2 se resumen las condiciones nutricionales ensayadas, correspondiendo la primera a la condición denominada de “referencia”. La alimentación sintética también contenía bicarbonato en relación 1:1 con el almidón alimentado y solución de macro y micronutrientes de acuerdo a lo establecido en la Tabla 2.1. La relación nitrógeno/fósforo se mantuvo constante en 5:1.

Tabla 4.2. Características de los ensayos con cantidades variables de nutrientes.

		Almidón	Nitrógeno	DQO/N
C rf / N rf	RF	1,5 g/L	12 mg/L	700/5
C alto / N alto	CANA	3 g/L	24 mg/L	700/5
C rf / N bajo	CRNB	1,5 g/L	6 mg/L	1360/5
C alto / N bajo	CANB	3 g/L	6 mg/L	3000/5
C alto / N rf	CANR	3 g/L	12 mg/L	1360/5

La puesta en marcha del sistema se llevó a cabo operando a un TRH de 12 horas, utilizando la condición de referencia de almidón y nitrógeno (RF en Tabla 4.2). Las distintas condiciones nutricionales se aplicaron operando primero con TRH de 6 horas y posteriormente con TRH de 3 horas. Entre cada condición se intercaló una alimentación RF. Se siguió el comportamiento del reactor para cada modalidad de operación por medio de las determinaciones de la eficiencia de remoción de almidón, concentración de AGV, azúcares reductores (glucosa), nitrógeno y biomasa. El grado de solubilización (fracción menor que 1 kDa) obtenida para cada condición ensayada se estableció por medio del análisis del fraccionamiento por tamaño molecular.

Los procedimientos de los análisis mencionados fueron descritos en el Capítulo 2 en los apartados correspondientes.

4.3.2 Ensayos en discontinuo

Los ensayos en batch se llevaron a cabo a 15°C, siguiendo las características mostradas en la Tabla 4.2. En todos ellos se agregó bicarbonato en relación 1:1 con el almidón alimentado y solución de macro y micronutrientes con el fin de cubrir las necesidades nutricionales de los componentes descritos en las Tablas 2.2 y 2.3.

El seguimiento de estos experimentos se llevó a cabo por medio de la determinación de azúcares totales y azúcares reductores. Las metodologías pertinentes fueron descritas en el Capítulo 2. El procedimiento seguido corresponde, en términos generales, a la metodología descrita para los ensayos de actividad hidrolítica (apartado 2.2.1). Los ensayos se dieron por finalizados en el momento en que el nivel de almidón en el medio alcanzó un valor mínimo estable. En este momento se cuantificó la hidrólisis del sustrato por medio del método de fraccionamiento por tamaño molecular descrito en el punto 2.2.4. Los lodos anaerobios utilizados son del tipo hidrolítico, obtenidos de la operación del reactor descrita en el Capítulo 3, y su caracterización se presentó en la Figura 3.24.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Operación en continuo

Tras la puesta en marcha del reactor, llevada a cabo con un TRH de 12 horas, que se extendió durante 20 días, se operó con un TRH de 6 horas, con una extensión de 30 días y, finalmente, con un TRH de 3 horas durante casi 90 días. En este último caso tuvieron lugar problemas operacionales debidos a la inestabilidad de la biomasa, con reiterados episodios de flotación. Se hizo necesario agregar calcio, en forma de CaCl_2 anhidro, a partir del día 90 de operación, con el propósito de aumentar la densidad de la biomasa, haciéndola más compacta (Yu *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2003).

El resumen de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 4.3 para la operación con el TRH de 6 horas, en la Tabla 4.4 para el TRH de 3 horas y en la Tabla 4.5 para el TRH de 3 horas y adición de calcio en la alimentación. El comportamiento del sistema para cada condición ensayada se obtuvo del análisis de muestras extraídas luego de 12 tiempos de residencia para el TRH de 6 horas y 20 para el TRH de 3 horas. Los valores de la condición RF corresponden al promedio de cinco muestras: inicio, final y entre cada condición. Se presenta, además, la desviación estándar.

El orden en que se mencionan las condiciones corresponde al orden en que fueron aplicadas. Para el TRH de 3 horas, la condición CANR fue cambiada a la segunda posición, luego de CANA.

De los resultados presentados destaca el hecho de que en las tres operaciones realizadas la condición RF tuvo el comportamiento esperado, acorde a los resultados descritos en el Capítulo 3.

Por otro lado, se hizo un seguimiento de la DQO de la alimentación y salida, determinándose que, para toda la operación del reactor, el efluente mantiene un $90,2 \pm 7,5\%$ de la $\text{DQO}_{\text{total}}$ y un $86,4 \pm 7,4\%$ de la fracción soluble. Además, al comparar el DQO teórico del efluente, calculado a partir de los componentes identificados (AGV, SSV, almidón, glucosa), con el medido, se tiene que el primero corresponde al $92,9 \pm 9,4\%$ por lo que se considera que, en ninguna de las etapas de operación, se ignoró la presencia de algún componente importante.

Tabla 4.3. Operación con el TRH de 6 h, con nitrógeno y carbono variables.

	TRH 6 horas				
	CANA	CRNB	CANB	CANR	RF
VCO (kg _{almidón} /m ³ ·d)	12	6	12	12	6
% degradación almidón	98,7	71,0	99,4	99,3	99,8±0,4
% acidificación ¹	66,0	6,9	58,1	75,0	58,2±4,1
Velocidad N alimentado ²	16,2	4,1	5,0	10,1	7,7±1,4
% nitrógeno remanente ³	13,8	45,0	90,0	37,5	24,4±4,2
% glucosa en efluente ⁴	4,0	33,2	9,5	4,7	6,2±3,9

Nota (1) % de DQO_{alimentado} convertido a AGV; (2) velocidad másica de nitrógeno alimentado mg_N/g_{SSV}·d; (3) porcentaje de N en el efluente en relación al N alimentado; (4) % de azúcares totales que permanecen como glucosa en el efluente.

Tabla 4.4. Operación con el TRH de 3 h, con nitrógeno y carbono variables.

	TRH 3 horas				
	CANA	CANR	CRNB	CANB	RF
VCO (kg _{almidón} /m ³ ·d)	---	24	12	24	12
% degradación almidón	---	95,9	86,9	51,0	95±2,6
% acidificación ¹	---	36,3	49,6	30,2	61,7±7,7
Velocidad N alimentado ²	---	32,1	26,5	17,7	36±7,2
% nitrógeno remanente ³	---	21,7	33,3	36,7	19,7±9,8
% glucosa en efluente ⁴	---	2,4	5,6	9,0	1,9±0,7

Nota (1) % de DQO_{alimentado} convertido a AGV; (2) velocidad másica de nitrógeno alimentado mg_N/g_{SSV}·d; (3) porcentaje de N en el efluente en relación al N alimentado; (4) % de azúcares totales que permanecen como glucosa en el efluente.

Tabla 4.5 Operación con el TRH de 3 h + calcio, con nitrógeno y carbono variables.

	TRH 3 horas + calcio				
	CANA	CANR	CRNB	CANB	RF
VCO (kg _{almidón} /m ³ ·d)	24	24	12	24	12
% degradación almidón	83,7	63,9	65,7	65,8	94±0,9
% acidificación ¹	27,8	28,1	35,6	37,6	55,9±7
Velocidad N alimentado ²	32,6	15,3	6,8	7,4	14,6±1,5
% nitrógeno remanente ³	24,2	19,2	31,7	48,3	32,2±8
% glucosa en efluente ⁴	23,0	7,0	38,2	16,7	3,5±1,1

Nota (1) % de DQO_{alimentado} convertido a AGV; (2) velocidad másica de nitrógeno alimentado mg_N/g_{SSV}·d; (3) porcentaje de N en el efluente en relación al N alimentado; (4) % de azúcares totales que permanecen como glucosa en el efluente.

En la operación con TRH de 6 horas, la degradación de almidón se mantiene en valores cercanos al 100%, con excepción del ensayo CRNB. Al analizar las variables de “nitrógeno remanente” y “glucosa en el efluente”, se observa que hay una correlación con la cantidad de nitrógeno alimentado, de manera que al parecer se debería suministrar nitrógeno al menos a una velocidad de $5 \text{ mg}_N/\text{g}_{\text{SSV}}\cdot\text{d}$, pues por debajo de ese valor se dificultaría el proceso de hidrólisis de almidón, con una baja acidificación y una alta acumulación de glucosa en el efluente. En el ensayo CANB se obtiene la mayor acumulación de nitrógeno a la salida del sistema, lo que podría deberse a una mayor lisis celular debido al stress por nitrógeno y al exceso de carbono, pues según se observa en la Figura 4.1, que muestra el perfil obtenido para la biomasa (SST y SSV) durante los 140 días de operación, la concentración de biomasa fue disminuyendo durante las dos primeras etapas, a pesar de haberse inoculado al inicio de cada etapa con aproximadamente $7 \text{ g}_{\text{SSV}}/\text{L}$. En sistemas con bajo crecimiento celular y con elevados TRS puede producirse una mayor lisis celular debido a que se propicia un mayor metabolismo endógeno (Liao *et al.*, 2001). La biomasa logró estabilizarse al incluir calcio en la alimentación.

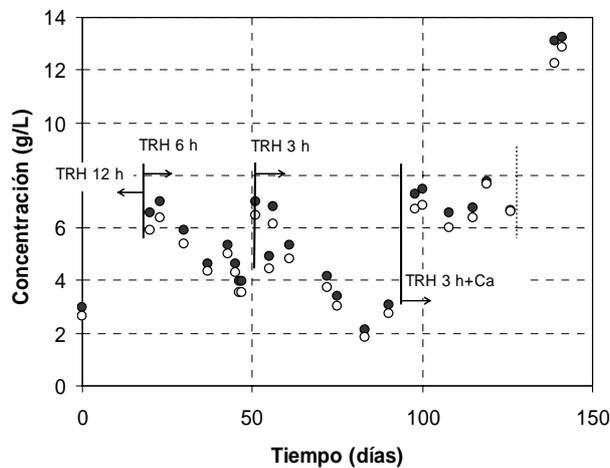


Figura 4.1. Evolución de la concentración de SST (●) y SSV (○) en la operación del reactor, como parámetro de determinación de biomasa.

El proceso de autólisis puede ser descrito como una autodegradación enzimática que involucra la activación de una serie de enzimas clave, obteniéndose un catabolismo del contenido intracelular (McIntyre *et al.*, 2000). Este fenómeno suele darse ante la falta de disponibilidad de fuente de energía que lleva a la célula a mantener el metabolismo endógeno por medio del consumo de los componentes intracelulares, para así disminuir la cantidad de biomasa que es necesario mantener. Esto podría deberse a que la velocidad con que el nitrógeno ingresa al sistema es menor que la velocidad de captación del nutriente requerida para llevar a cabo sus procesos anabólicos. Mientras que la síntesis celular de moléculas de RNA, DNA y proteínas es energéticamente costosa, no lo es el rendimiento energético por unidad de masa, de manera que muchas células almacenan energía en forma de polifosfatos y glucógeno (Wells y Russell, 1996). El proceso de autólisis es común en los hongos filamentosos, en condiciones de escasez de nutrientes, como estrategia de supervivencia (McIntyre *et al.*, 2000).

Debido al comportamiento de la biomasa obtenido frente al stress por déficit de nitrógeno, se decidió dejar para el final de la serie de condiciones nutricionales las reducciones en la fuente de nitrógeno disponible (ensayos CRNB y CANB), en la operación con el TRH de 3 horas; en efecto si se mantuviera la lisis celular que ocasiona la disminución de la biomasa, el aporte de nitrógeno reducido se llevaría a cabo en momentos en que se contara con menos biomasa en el reactor.

La respuesta de la biomasa a las restricciones nutricionales impuestas se ajusta a lo indicado en trabajos llevados a cabo con cultivos puros con déficit nutricional (Ferenci, 1999; Dauner *et al.*, 2001), observándose que ante un exceso de fuente de carbono los microorganismos crecerán según le permita la cantidad de nitrógeno disponible, de manera que en estas condiciones se espera que la biomasa tenga dificultad para desarrollarse debido a la inhibición del proceso de síntesis celular por déficit de nitrógeno (Cooney *et al.*, 1976), sumado además a la escasez de fósforo. Por otra parte, también se ha determinado que en presencia de un desacoplamiento de los procesos catabólicos y anabólicos producto de un exceso de carbono (en relación al nitrógeno disponible) las bacterias tienen la capacidad de cambiar las vías metabólicas con el fin de disminuir la generación de energía, que está en exceso con respecto al crecimiento que es posible

desarrollar para los nutrientes disponibles (Russell y Cook, 1995). Dentro de esas vías alternativas, se ha descrito la generación de metilglioxal, en lugar de piruvato, a partir de la ramificación del proceso de degradación de glucosa. Este compuesto altamente reactivo es tóxico, destruyendo moléculas de DNA, RNA y proteínas, provocando la muerte celular; sin embargo también está establecido que las bacterias tienen la capacidad de detoxificarse eliminando este compuesto (Ferguson *et al.*, 1998). Las variables analizadas no permiten corroborar este fenómeno.

La operación con el TRH de 3 horas sin calcio corroboró el efecto perjudicial de la restricción de la concentración de nitrógeno disponible para la biomasa, más que su relación con el carbono alimentado. Así, en los dos ensayos en que el nitrógeno suministrado es menor que la concentración de referencia (CRNB y CANB) se obtiene la menor degradación de almidón, la mayor acumulación de glucosa y el mayor porcentaje de nitrógeno remanente, siendo más evidente el efecto en el ensayo CANB. Sin embargo, no es posible diferenciar entre el efecto nutricional de la razón DQO/N aplicada y las secuelas de la serie de cambios nutricionales a la que fue sometida la biomasa. La operación con condiciones nutricionales de referencia (RF) no presentó mayores inconvenientes (al igual que durante la operación con el TRH de 6 horas), destacándose la baja dispersión de los resultados (baja desviación estándar) lo que indica que tras haber aplicado cada condición nutricional, el sistema se recupera favorablemente, obteniéndose los resultados esperados de degradación de almidón, acidificación, acumulación de glucosa y nitrógeno remanente. Por otra parte se observa que, en general para las tres etapas de la operación del reactor, el parámetro de acidificación no muestra una correlación clara con las diversas condiciones nutricionales ensayadas, siendo especialmente bajo, en comparación con la operación de referencia, para el TRH de 3 horas sin y con calcio.

Haciendo un análisis desde el punto de vista de la velocidad de carga orgánica (VCO), se observa que para las tres VCO aplicadas: 6, 12 y 24 $\text{kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, los ensayos con condiciones nutricionales deficitarias en nitrógeno (en relación a la cantidad de biomasa presente en el reactor) proporcionan los peores resultados de degradación y/o acidificación.

La inestabilidad del sistema durante esta etapa de la operación no permitió llevar a cabo convenientemente el ensayo CANA, debido a que la biomasa tendió a flotar, debido al desprendimiento de gas (CO₂ proveniente de la neutralización de AGV generados y del metabolismo celular).

La adición de calcio trajo consigo cambios en algunas de las respuestas obtenidas, lográndose en primer lugar la estabilidad de la biomasa, evitando el fenómeno de flotación. Esta etapa de operación se caracterizó también por no presentar una disminución en la concentración de biomasa. Sin embargo, una mayor concentración de biomasa no supone necesariamente que toda ella sea viable, lo que explicaría el hecho de que, en general para las condiciones nutricionales ensayadas, se obtienen peores resultados que para la operación sin calcio, con menores degradaciones de almidón, menor acidificación, mayor acumulación de glucosa en el efluente y valores similares de nitrógeno remanente. Sin embargo, para la alimentación RF el comportamiento del reactor se asemeja a lo descrito para la operación sin calcio, presentando una leve menor acidificación y aumento del nitrógeno remanente y glucosa acumulada. Se ha reportado la acción beneficiosa del ión calcio en el proceso de granulación anaerobia (Gonzalez-Gil *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001; Batstone *et al.*, 2002) y aerobia (Jiang *et al.*, 2003), sospechándose que los iones Ca⁺² se unen a los grupos cargados negativamente presentes en la superficie bacteriana y polisacáridos extracelulares actuando como puentes que promueven la agregación bacteriana. Por otro lado, el calcio también está implicado a nivel celular, controlando la función de una serie de proteínas, existiendo evidencia de que afecta la estabilidad de las proteínas, la actividad enzimática y las señales transduccionales (Michiels *et al.*, 2002). De esta manera y a partir de los resultados obtenidos (ver Tabla 4.5), la acción de este ión sería una mezcla de efectos, no siendo posible determinarlos individualmente.

Finalmente, en la última fase de la operación y tras mantener la alimentación sin cambios durante 9 días (63 tiempos de residencia), la biomasa creció hasta alcanzar 13 g/L (ver Figura 4.1), valor mas próximo a lo obtenido en la operación descrita en el Capítulo 3, lo que indica que una vez suprimidas las condiciones nutricionales estresantes la biomasa es capaz de desarrollarse normalmente.

Los comportamientos descritos anteriormente se reafirman al analizar el fraccionamiento de tamaños moleculares de las muestras obtenidas durante la operación con el TRH de 3 horas y calcio, para las condiciones CANB, CANR y CRNB. Se analizó también una muestra RF, a modo de comparación.

Así, según se observa en la Figura 4.2, en los ensayos donde el nitrógeno está presente en menor concentración, independiente de la proporción con el almidón alimentado (CRNB: 6,8 g_N/g_{SSV}·d, CANB: 7,4 g_N/g_{SSV}·d), se obtiene la mayor fracción no hidrolizada (tamaño mayor que 100 kDa) y en consecuencia las menores solubilizaciones (tamaño menor que 1 kDa). Al comparar la condición CANR y CRNB (con igual relación DQO/N) se ve que en presencia de una mayor concentración de nitrógeno, mejora la eficiencia del sistema (tal como se observó en la Tabla 4.3). Por otro lado, los ensayos CANB y CANR equivalen a la misma VCO alimentada (24 kg_{almidón}/m³·d), observándose el mismo efecto al limitar el nitrógeno disponible.

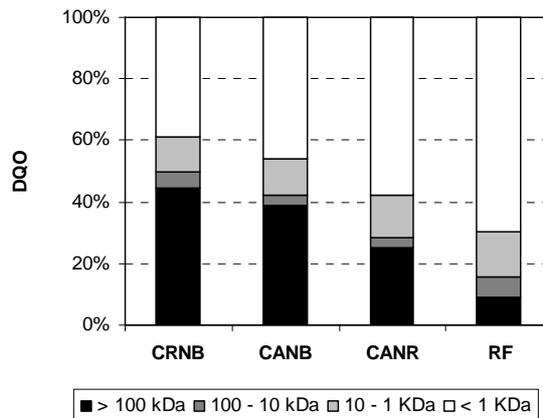


Figura 4.2. Distribución de tamaños moleculares de los ensayos CRNB, CANB, CANR y RF durante la operación con TRH de 3 horas + calcio.

4.4.2 Ensayos en discontinuo

Los ensayos en continuo se llevaron a cabo sometiendo a la biomasa a constantes cambios en las características nutricionales de la alimentación, de tal manera de que los efectos de esos cambios podrían haberse solapado. Los ensayos en batch

pretendieron determinar la influencia de las variaciones nutricionales en la alimentación y consideraron las mismas condiciones evaluadas en la operación en continuo. Los resultados se observan en la Figura 4.3, en donde se ha expresado la cinética de degradación del almidón en forma adimensional, de manera que S_0 es la concentración de almidón al inicio del ensayo ($t=0$) y S corresponde a la medida en un tiempo dado.

A partir de dichos resultados, no resultan tan claras las diferencias como las encontradas en la operación en continuo. Aunque resalta el hecho de que las cinéticas más rápidas son las que tienen la concentración de nitrógeno de referencia (CANR y RF), se hubiera esperado el mismo comportamiento para el ensayo CANA, el que resultó ser el más lento. Por otro lado, las condiciones en los que limita el nitrógeno (CANB y CANR) presentan cinéticas más lentas, acorde con lo establecido en el estudio en continuo.

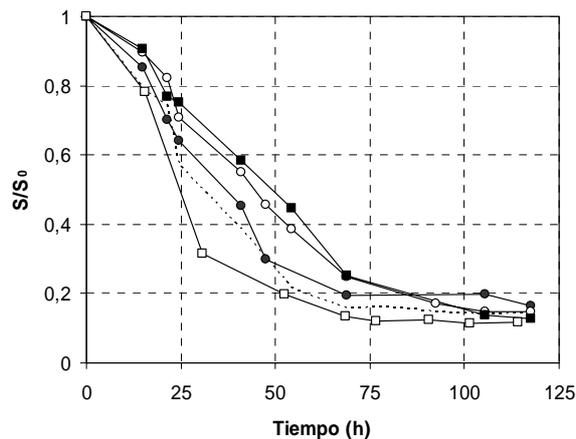


Figura 4.3. Cinética de degradación de almidón en ensayos batch con características nutricionales variables. --- RF; ■ CANA; □ CANR; ● CRNB; ○ CANB.

El análisis de la distribución de tamaños moleculares de las muestras degradadas completamente, tampoco manifestó diferencias significativas, según los resultados mostrados en la Figura 4.4. La mayor degradación, como era de esperarse, la tuvo el ensayo RF. Las otras condiciones ensayadas mostraron comportamientos similares entre si, pero con una mayor fracción superior a 100

kDa (almidón no degradado) y una menor solubilización (fracción menor que 1 kDa). El análisis de esta distribución molecular en tiempos más tempranos de degradación podría haber aportado mayor información.

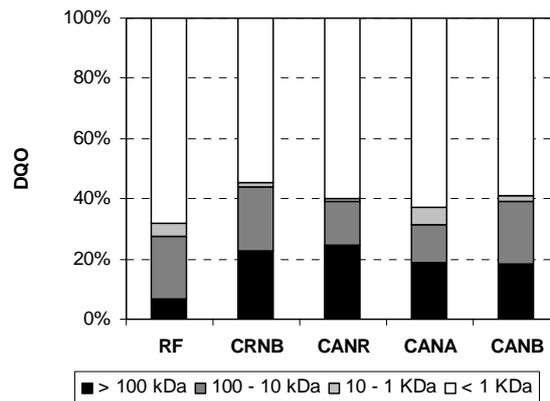


Figura 4.4. Fraccionamiento por tamaños moleculares al final de los ensayos batch con cantidades variables de nitrógeno y almidón.

4.4.3 Caracterización de la biomasa

La biomasa obtenida al cabo de los experimentos presentados en este capítulo se caracterizó en términos de actividad hidrolítica y acidogénica. Los resultados se presentan en la Figura 4.5, incluyéndose los datos correspondientes al inóculo original (metanogénico) y de la biomasa utilizada como inóculo en los ensayos de este capítulo. Como se observa, la biomasa desarrollada en presencia de calcio aumenta notablemente su actividad hidrolítica y en menor medida la acidogénica, aumentando la aplicabilidad de este proceso al ser posible operar con una mayor carga orgánica o disminuir el tamaño de reactor requerido.

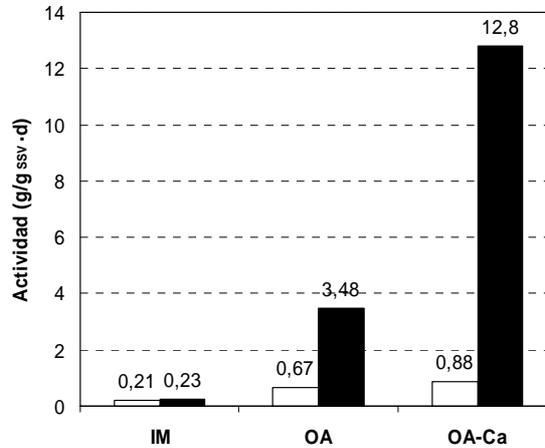


Figura 4.5. Caracterización de la biomasa desarrollada en el proceso de degradación de almidón a baja temperatura y con adición de calcio (OA-Ca) en comparación con el inóculo metanogénico original (IM) y la biomasa proveniente de la operación con almidón descrita en el capítulo 3 (OA). Símbolos: actividad acidogénica (blanco) y actividad hidrolítica (negro).

4.5 Conclusiones

A partir de los resultados presentados se concluye que en el proceso de hidrólisis-acidificación psicrófila de almidón soluble de alto peso molecular, el comportamiento de la biomasa, en cuanto a la etapa de hidrólisis, depende de la concentración de nitrógeno disponible independientemente de la proporción en que se encuentra con la fuente de carbono alimentada (relación DQO/N), efecto que no se vio reflejado en los resultados correspondientes a la fase de acidogénesis.

Así, en la operación con un TRH de 3 horas y VCO de $24 \text{ kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ se alcanza aproximadamente un 60% de solubilización (correspondiente a la fracción menor que 1 kDa) si el nitrógeno alimentado se mantiene en la concentración de referencia, valor que disminuye al 45% en caso de que este nutriente sea deficitario. En el caso de la operación con VCO de $12 \text{ kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$, se obtiene un comportamiento similar ante la carencia de nitrógeno, si bien la solubilización mejora hasta un 70% si el nitrógeno se encuentra en el nivel de referencia.

La biomasa mostró una importante tendencia a flotar, observándose, adicionalmente, la disminución sostenida de la concentración de biomasa en el reactor, debido al bajo crecimiento celular por la deficiencia cíclica del nitrógeno alimentado. La presencia de nitrógeno remanente en proporciones elevadas en la corriente de salida del reactor (incluso para las condiciones en las que se limitó fuertemente por este nutriente), hace pensar en el fenómeno de lisis celular. La adición de calcio estabilizó notablemente la biomasa mejorando su sedimentación y permitiendo mantener constante su concentración en el reactor.

La biomasa desarrollada, al cabo de los experimentos descritos en este capítulo, presenta una elevada capacidad hidrolítica, 56 veces mayor que la del inóculo metanogénico. La actividad acidogénica, sin embargo, no se ve incrementada de la misma forma, aumentando solo 4 veces en relación este inóculo.

4.6 Referencias

- Batstone,D.J., Landelli,J., Saunders,A., Webb,R.I., Blackall,L.L. and Keller,J. (2002) The influence of calcium on granular sludge in a full-scale UASB treating paper mill wastewater. *Water Science and Technology*, **45** (10), 187-193.
- Burgess,J.E., Quarmby,J. and Stephenson,T. (1999) Role of micronutrients in activated sludge-based biotreatment of industrial effluents. *Biotechnology Advances*, **17** (1), 49-70.
- Cooney,C.L., Wang,D.I.C. and Mateles,R.I. (1976) Growth of *Enterobacter aerogenes* in a chemostat with double nutrient limitations. *Applied and Environmental Microbiology*, **31** (1), 91-98.
- Dauner,M., Storni,T. and Sauer,U. (2001) *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *Journal of Bacteriology*, **183** (24), 7308-7317.
- Demirel,B. and Yenigun,O. (2002) Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **77** (7), 743-755.
- Diez,M.C., Castillo,G., Aguilar,L., Vidal,G. and Mora,M.L. (2002) Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* kraft mill wastewater. *Bioresource Technology*, **83** (2), 131-138.
- Ferenci,T. (1999) Regulation by nutrient limitation. *Current Opinion in Microbiology*, **2** (2), 208-213.
- Ferguson,G.P., Totemeyer,S., MacLean,M.J. and Booth,I.R. (1998) Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Archives of Microbiology*, **170** (4), 209-219.

- Freedman, D.L., Payauys, A.M. and Karanfil, T. (2005) The effect of nutrient deficiency on removal of organic solvents from textile manufacturing wastewater during activated sludge treatment. *Environmental Technology*, **26** (2), 179-188.
- Gonzalez-Gil, G., Lens, P.N.L., Van Aelst, A., Van As, H., Versprille, A.I. and Lettinga, G. (2001) Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (8), 3683-3692.
- Guedon, E., Desvaux, M. and Petitdemange, H. (2000) Kinetic analysis of *Clostridium cellulolyticum* carbohydrate metabolism: Importance of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate branch points for distribution of carbon fluxes inside and outside cells as revealed by steady-state continuous culture. *Journal of Bacteriology*, **182** (7), 2010-2017.
- Holubar, P., Andorfer, C. and Braun, R. (1999) Effects of nitrogen limitation on biofilm formation in a hydrocarbon-degrading trickle-bed filter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51** (4), 536-540.
- Jefferson, B., Burgess, J.E., Pichon, A., Harkness, J. and Judd, S.J. (2001) Nutrient addition to enhance biological treatment of greywater. *Water Research*, **35** (11), 2702-2710.
- Jiang, H.L., Tay, J.H., Liu, Y. and Tay, S.T. (2003) Ca⁺² augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. *Biotechnology Letters*, **25** (2), 95-99.
- Konopka, A. (2000) Microbial physiological state at low growth rate in natural and engineered ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, **3** (3), 244-247.
- Leahy, J.G. and Colwell, R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, **54** (3), 305-315.
- Liao, B.Q., Allen, D.G., Droppo, I.G., Leppard, G.G. and Liss, S.N. (2001) Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research*, **35** (2), 339-350.
- Liu, X.Q. and Ferenci, T. (1998) Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **180** (15), 3917-3922.
- McCarty, P.L. and Mosey, F.E. (1991) Modelling of anaerobic digestion processes (A discussion of concepts). *Water Science and Technology*, **24** (8), 17-33.
- McHugh, S., Carton, M., Collins, G. and O'Flaherty, V. (2004) Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16-37 °C. *Fems Microbiology Ecology*, **48** (3), 369-378.
- McIntyre, M., Berry, D.R. and McNeil, B. (2000) Role of proteases in autolysis of *Penicillium chrysogenum* chemostat cultures in response to nutrient depletion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53** (2), 235-242.
- Merrick, M.J. and Edwards, R.A. (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiological Reviews*, **59** (4), 604-&.

- Michiels, J., Xi, C.W., Verhaert, J. and Vanderleyden, J. (2002) The functions of Ca⁺² in bacteria: a role for EF-hand proteins? *Trends in Microbiology*, **10** (2), 87-93.
- Mulder, M.M., Vandergulden, H.M.L., Postma, P.W. and Vandam, K. (1988) Effect of macromolecular composition of microorganisms on the thermodynamic description of their growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, **936** (3), 406-412.
- Novaes, R.F.V. (1986) Microbiology of anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, **18** (12), 1-14.
- Peng, Y., Gao, C., Wang, S., Ozaki, M. and Takigawa, A. (2003) Non-filamentous sludge bulking caused by a deficiency of nitrogen in industrial wastewater treatment. *Water Science and Technology*, **47** (11), 289-295.
- Russell, J.B. and Cook, G.M. (1995) Energetics of bacterial-growth - Balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews*, **59** (1), 48-62.
- Slade, A.H., Ellis, R.J., vanden Heuvel, M. and Stuthridge, T.R. (2004) Nutrient minimisation in the pulp and paper industry: an overview. *Water Science and Technology*, **50** (3), 111-122.
- Torriani, A.M. (1990) From cell-membrane to nucleotides - the phosphate regulon in *Escherichia Coli*. *Bioessays*, **12** (8), 371-376.
- Wells, J.E. and Russell, J.B. (1996) Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly? *Journal of Dairy Science*, **79** (8), 1487-1495.
- Xu, R. and Obbard, J.P. (2004) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated beach sediments treated with nutrient amendments. *Journal of Environmental Quality*, **33** (3), 861-867.
- Yu, H.Q., Tay, J.H. and Fang, H.H. (2001) The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Research*, **35** (4), 1052-1060.
- Zimmer, D.P., Soupene, E., Lee, H.L., Wendisch, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Bender, R.A. and Kustu, S. (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97** (26), 14674-14679.

CAPÍTULO QUINTO

Hidrólisis-acidogénesis anaerobia de gelatina

RESUMEN

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo es el estudio de la influencia del Tiempo de Residencia Hidráulico (TRH) sobre el comportamiento de un reactor operado en condiciones psicrófilas, en el proceso de hidrólisis-acidogénesis anaerobia de proteínas de elevado peso molecular. Con este fin, se evaluó la degradación de una proteína modelo (gelatina de 80-100 blooms) en un reactor de lecho ascendente operado con TRH de 12, 21 y 36 horas. En los dos primeros casos se acopló un equipo de ultrafiltración (UF) tangencial con el fin de elevar el tiempo de retención de compuestos de peso molecular superior a 10 kDa provenientes de la hidrólisis incompleta de la gelatina. Los experimentos realizados (a 15°C y pH ~ 7,0) determinaron que la hidrólisis de la gelatina depende del TRH de operación, alcanzando un máximo de 65% para un TRH de 36 horas y un mínimo cercano al 40% para el TRH de 12 horas. Dicho parámetro también afecta el grado de amonificación y acidificación del sustrato, así como la distribución de tamaño molecular del efluente obtenido en cada caso. Así, para un TRH de 12 horas, la fracción de tamaño superior a 10 kDa no es degradada, mientras que la fracción intermedia (1-10 kDa) desaparece al ser completamente metabolizada, de tal manera que el 60% de los componentes presentan un tamaño menor que 1 kDa. La degradación de la fracción recalcitrante mejora con el incremento del TRH, obteniéndose un efluente con casi un 95% de moléculas solubles para el mayor TRH ensayado. El acoplamiento del sistema de UF permite obtener un efluente con cerca del 100% de moléculas de tamaño inferior a 1 kDa. Finalmente, se analizó la conveniencia de utilizar un sistema de hidrólisis anaerobia como tratamiento previo a un sistema convencional de lodos activos, determinándose, mediante la técnica de OUR, que la fracción fácilmente biodegradable de la corriente de alimentación aumenta apreciablemente al utilizar la digestión anaerobia como pretratamiento.

INDICE

5.1	INTRODUCCIÓN.....	5-3
5.2	OBJETIVOS	5-6
5.3	MATERIALES Y MÉTODOS	5-6
5.3.1	<i>Ensayos en discontinuo</i>	5-6
5.3.2	<i>Ensayos en continuo</i>	5-7
5.3.3	<i>Determinación de OUR</i>	5-8
5.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5-13
5.4.1	<i>Caracterización del inóculo</i>	5-13
5.4.2	<i>Ensayos en continuo</i>	5-16
5.4.3	<i>Caracterización de la biomasa adaptada a la degradación de gelatina</i> ..	5-24
5.4.4	<i>Análisis de biodegradabilidad por medio de la medida de OUR</i>	5-24
5.5	CONCLUSIONES	5-26
5.6	REFERENCIAS	5-27

5.1 Introducción

En los últimos años el proceso de digestión anaerobia está siendo utilizado crecientemente como método de descontaminación de efluentes industriales (Frankin, 2001), constituyendo una tecnología consolidada. Aunque la composición de las aguas residuales industriales es muy variable, dependiendo fuertemente de su origen, las proteínas son frecuentemente su principal componente (Metcalf y Eddy, 1996), y su degradación, realizada por proteasas extracelulares, suele ser lenta e incompleta (Fang y Chung, 1999; Guerrero *et al.*, 1999). Por otro lado, la presencia de elevadas concentraciones de proteínas puede causar problemas operacionales como aparición de espuma y flotación de biomasa (Lettinga y Pol, 1991) lo que puede ocasionar el lavado de biomasa y/o la formación de una capa de espuma en la zona del separador gas-líquido-sólido de los reactores UASB. Esto dificulta la aplicación de esta tecnología a ciertos tipos de aguas residuales como por ejemplo de la industria láctea y cárnica, por lo que para dichos casos se ha recomendado la utilización de sistemas en dos etapas (Pol y Lettinga, 1986).

En los estudios existentes en relación a la hidrólisis-acidogénesis anaerobia de macromoléculas, es destacable el hecho de que si se consideran los sustratos tipificados (es decir, carbohidratos, proteínas y lípidos), las proteínas han sido las menos examinadas. Fang y Chung (1999) analizaron el proceso mesófilo de un agua residual proteica utilizando peptona como molécula modelo, obteniendo un máximo de 80% de degradación con un TRH de 9 horas y determinando que la eficiencia está limitada por la etapa de hidrólisis de la proteína. Un estudio mas completo fue llevado a cabo por Yu y Fang (2003), quienes analizaron la influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis/acidogénesis de gelatina determinando que el pH tiene un efecto mas significativo. En un estudio posterior, los mismos autores determinan el escaso efecto del TRH en el proceso de degradación mesófila de gelatina a pH 5,5 (Fang y Yu, 2002), obteniendo una eficiencia de hidrólisis de 84% para un TRH de 4 horas y cercano a 90% para THR de 24 horas.

Algunos autores han examinado el proceso de degradación anaerobia desde el punto de vista del tamaño molecular del contaminante. Aunque la clasificación de

las fracciones varía entre los diversos autores (Mahmoud et al., 2003), es claro que las fracciones coloidal y sedimentable representan fracciones que pueden llegar a ser difícilmente degradables (Ginestet *et al.*, 2002; Marani *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha visto que una fracción importante está formada por macromoléculas, es decir aquellas que tienen un peso molecular mayor que 1 kDa (Levine *et al.*, 1985; Logan y Jiang, 1990; Fuchs *et al.*, 2003), la cual pese a ser soluble, no puede ingresar directamente a la célula para ser metabolizadas, requiriendo la acción de enzimas extracelulares de acción específica que tienen como función hidrolizar estas macromoléculas (Eastman y Ferguson, 1981).

Una característica importante de las macromoléculas es que su difusividad es mucho menor que la de las partículas pequeñas, por lo que de acuerdo a la Ley de Fick esto puede suponer un factor limitante.

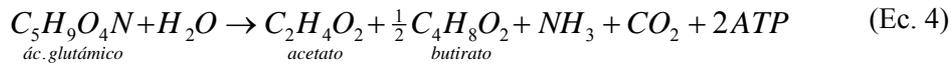
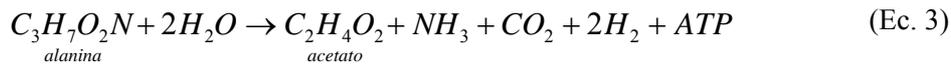
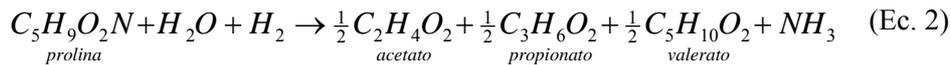
Los sustratos proteicos, en un ambiente anaerobio, son hidrolizados por enzimas extracelulares, llamadas proteasas, a péptidos y aminoácidos los cuales posteriormente son fermentados principalmente a ácidos grasos, amonio, dióxido de carbono, hidrógeno y azufre reducido (McInerney, 1988).

La actividad proteolítica es una característica común de las bacterias mesófilas pudiendo expresarse también a menores temperaturas a pesar de la serie de dificultades asociadas a los sistemas psicrófilos. Sin embargo la operación a baja temperatura también involucraría la acción de organismos psicotróficos, organismos cuya temperatura óptima es mayor a 20°C pero que pueden actuar adecuadamente a baja temperatura, sin ser parte natural de dichos ambientes (Gounot, 1986). En la operación a baja temperatura tiene lugar una mayor solubilidad de compuestos gaseosos, el aumento de la viscosidad de los líquidos y el efecto cinético negativo sobre las reacciones químicas y biológicas que las hace mas lentas que en condiciones mesófilas (Lettinga et al., 2001). Además, la afinidad de los microorganismos por sus sustratos también disminuye (Nedwell, 1999).

El proceso de fermentación de aminoácidos puede llevarse a cabo por medio de oxidación anaerobia unido a la producción de hidrógeno lo que requiere la presencia de bacterias utilizadoras de hidrógeno (Ramsay y Pullammanappallil, 2001), o alternativamente, los aminoácidos pueden ser degradados en pares por

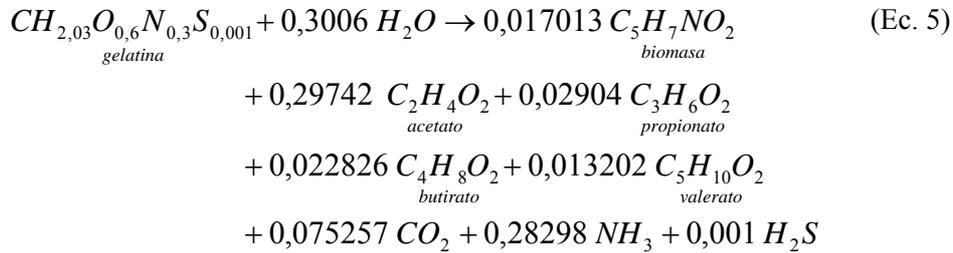
medio de la reacción de Stickland en donde un aminoácido es desaminado oxidativamente y los electrones producidos son transferidos a otro aminoácido que es reductivamente desaminado (Nisman, 1954). Sin embargo, en presencia de cultivos mixtos y mezclas de aminoácidos, la degradación desacoplada de aminoácidos solo ocurre si hay escasez de aminoácidos que puedan actuar como aceptores de electrones, lo que en el caso de proteínas como caseína, albúmina y gelatina se reduce a menos del 10% del total de aminoácidos fermentables (Nagase y Matsuo, 1982).

La gelatina es una proteína obtenida a partir de la hidrólisis parcial de colágeno de manera que su peso molecular puede variar entre 20 y 250 kDa, siendo ampliamente utilizado en diversas industrias incluyendo el área alimentaria, farmacéutica y fotográfica. Esta proteína está formada por la mezcla de 18 aminoácidos, destacando la presencia de glicina, prolina, hidroxiprolina, ácido glutámico y alanina, los que constituyen cerca del 80% del contenido aminoácido (GME-Gelatine Manufacturers of Europe, 2005). Las principales reacciones involucradas en la fermentación de dichos aminoácidos, asumiendo el mecanismo de Stickland (Ramsay y Pullammanappallil, 2001), se indican en las ecuaciones 1 - 4.



De esta manera, la mezcla de AGV formada está compuesta principalmente por acetato, propionato, butirato y valerato (Breure *et al.*, 1986; Ramsay y Pullammanappallil, 2001).

La reacción de acidogénesis, considerando la fermentación de todos los aminoácidos puede resumirse de la siguiente forma (Angelidaki *et al.*, 1999):



En esta reacción, los coeficientes estequiométricos se han ajustado de acuerdo a datos experimentales, en ensayos llevados a cabo en condiciones termofílicas, 55°C.

5.2 Objetivos

El objetivo de este trabajo es el estudio del proceso de degradación anaerobia de proteínas, utilizando gelatina como molécula modelo, en un reactor hidrolítico-acidogénico operado en el rango psicrófilo de temperatura. Se caracterizará la eficiencia del proceso en relación con la distribución de tamaños moleculares obtenida en el efluente a diferentes tiempos de residencia hidráulicos (TRH), estudiando además los beneficios asociados al acoplamiento de un sistema de ultrafiltración tangencial provisto de una membrana de 10 kDa.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Ensayos en discontinuo

La fase de experimentación en discontinuo comprendió ensayos de degradación de gelatina a 15°C y 37°C, con el fin de caracterizar las cinéticas de hidrólisis/acidogénesis en el rango psicrófilo y mesófilo de temperatura, respectivamente. En los ensayos se realizó el seguimiento de la concentración de gelatina (método de Biuret), amonio (método fenol-hipoclorito) y AGV (cromatografía gaseosa), según la metodología descrita en el Capítulo 2. Los ensayos se dieron por finalizados en el momento en que los niveles de proteína en el medio alcanzaron un valor mínimo estable. Las características de los ensayos se describen en la Tabla 5.1. Se definió la actividad proteolítica, $g_{\text{gelatina degradada}}/g_{\text{SSV}} \cdot d$, de forma equivalente al concepto de actividad hidrolítica utilizado en el Capítulo 3 para la degradación de almidón.

Tabla 5.1. Características de los ensayos batch de hidrólisis de gelatina.

Temperatura	15°C y 37 °C
Nutrientes	Similar a los de la Tabla 2.2 y 2.3 (0,5 mL/g _{gelatina})
Sustrato	Gelatina 80-100 blooms (Panreac): 2 g/L
Bicarbonato de sodio	1,5 g/L de bicarbonato
Inóculo	Lodo hidrolítico adaptado a la degradación de almidón, 2 g _{SSV} /L (características en la Tabla 6.3: con calcio)
Agitación	Estático

5.3.2 Ensayos en continuo

5.3.2.a Equipamiento experimental

El equipamiento experimental es similar al descrito en la sección 3.3.2.a del Capítulo 3, utilizando la configuración de reactor de lecho ascendente operando a una agitación mínima de 45 rpm. Para algunas condiciones de operación se acopló un sistema de ultrafiltración tangencial (UF) también descrito en dicho apartado, considerando la recirculación de la corriente de retenido al reactor con un caudal fijo de 5 mL/min.

5.3.2.b Metodología experimental

El reactor se operó con TRH de 12, 21 y 36 horas, correspondientes a Velocidades de Carga Orgánica (VCO) de 7, 4 y 2,3 kg_{DQO}/m³·d, respectivamente; incluyéndose una etapa de operación con acoplamiento de un sistema de ultrafiltración tangencial (UF) para los dos primeras condiciones de TRH. La alimentación utilizada fue descrita en la Tabla 2.1, considerando gelatina como fuente de carbono y nitrógeno. Se incluyó cloruro de calcio en la formulación debido a los efectos beneficiosos observados en los ensayos descritos en los Capítulos 4 y 6.

Como inóculo se utilizó biomasa no metanogénica adaptada a la degradación de carbohidratos, obtenida de la operación del reactor utilizando almidón como sustrato (detalle de la operación descrito en el Capítulo 4). La biomasa presenta

una actividad hidrolítica de $12,8 \text{ g}_{\text{almidón degradado}}/\text{g}_{\text{SSV}}\cdot\text{d}$ y actividad acidogénica de $0,88 \text{ g}_{\text{glucosa degradada}}/\text{g}_{\text{SSV}}\cdot\text{d}$, ambas determinadas a 15°C .

5.3.2.c Metodología analítica

El seguimiento de los reactores se llevó a cabo monitoreando las corrientes de entrada y salida del sistema, además de un punto intermedio (salida del reactor) para el caso de la operación con acoplamiento del sistema de ultrafiltración. Los parámetros críticos a analizar fueron la eficiencia de degradación de gelatina, concentración de amonio y AGV. A partir de dichos parámetros se definieron: el porcentaje de amonificación como la fracción de nitrógeno del efluente que permanece como amonio y el porcentaje de acidificación como la fracción de DQO del efluente que se encuentra en la forma de AGV. Finalmente, cada etapa de operación fue caracterizada en función del análisis de la distribución de tamaños moleculares obtenido en el efluente.

Todos los procedimientos de los análisis mencionados fueron descritos en el Capítulo 2 en los apartados correspondientes.

5.3.3 **Determinación de OUR**

La respirometría consiste en la medida del índice de respiración de la biomasa aerobia, determinándose la cantidad de oxígeno consumida por unidad de tiempo. Este método se utiliza para la determinación de constantes cinéticas, toxicidad, caracterización de aguas residuales y supervisión y control de las plantas de tratamiento de aguas residuales. La técnica más utilizada es la basada en la medida del Oxígeno Disuelto (OD) mediante un electrodo en fase líquida, conocida como OUR (Oxygen Uptake Rate) (Spanjers *et al.*, 1998).

En la presente investigación se utilizó esta técnica con el fin de comparar la cinética de degradación en condiciones aerobias de la alimentación proteica basada en gelatina y del efluente del sistema de tratamiento anaerobio operado con TRH de 12 horas sin y con acoplamiento de un sistema de UF. Además de obtener el respirograma de cada corriente, se determinó el rendimiento celular (Y) y la fracción fácilmente biodegradable (S_s) de cada uno, con el fin de analizar la

influencia de utilizar un proceso anaerobio hidrolítico como pretratamiento de un proceso aerobio de lodos activos convencional.

5.3.3.a Procedimiento experimental

Los ensayos de OUR se realizan a 25 °C, controlado mediante un baño de agua termostatzado con un calefactor Electro Ltd. modelo Clifton. El montaje incluye:

- electrodo de oxígeno Desin Instrument S.A., modelo ISI,
- transmisor Desin Instrument serie TM 3659, conectado al electrodo de oxígeno,
- agitador Hanna Instrument modelo Speed, a una velocidad no superior a los 100 rpm para evitar la formación de vórtice que pudiera provocar un aporte importante de oxígeno atmosférico,
- PLC Siemens Simatic S7-200, que lleva a cabo la operación lógica de encendido y apagado de la aireación mediante la introducción de puntos de consigna mínimo y máximo. La concentración del Oxígeno Disuelto (OD) se mantiene entre 2 y 5 mg/L durante el ensayo. De acuerdo a los puntos de consigna, el PLC proporciona energía a un aireador tipo pecera. Para la introducción de la lógica de trabajo al PLC se utiliza el software STEP 7-Micro/WIN 32 Versión 3.1.
- ordenador para llevar a cabo la adquisición de los datos de OD. Para ello se utiliza el sistema de monitorización y control de procesos Acquirer versión 3.2.11, desarrollado en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela. Los datos adquiridos son procesados en una plantilla Excel para el cálculo de pendientes y su regresión lineal. Las pendientes de disminución de oxígeno disuelto corresponden al valor de OUR para ese tiempo de ensayo. Los valores de OUR obtenidos son representados y ajustados a una curva mediante el software Table Curve 2D versión 5.01.

En la Figura 5.1 se presenta un esquema del montaje utilizado. El procedimiento es el siguiente:

- En un matraz de 500 mL, se añade un determinado volumen del efluente a estudiar, de DQO conocida, y se completa con agua destilada hasta un volumen de 400 mL,
- la mezcla se airea hasta conseguir una concentración de 6-7 mg O₂/L,
- se adiciona un volumen de lodos activos tal que permita obtener la relación sustrato/biomasa (F/M) deseada,
- se adiciona agua hasta alcanzar un volumen final de 500 mL y una concentración de DQO aproximada de 500 ppm,
- se comienza con la adquisición automática de los datos de concentración de OD, que se realiza cada 4 segundos durante todo el periodo del ensayo,
- adicionalmente, se determina la variación del DQO en el tiempo. Para ellos se toma una muestra de 5 mL cada 2 horas y se analiza de acuerdo al procedimiento correspondiente descrito en el Capítulo 2.

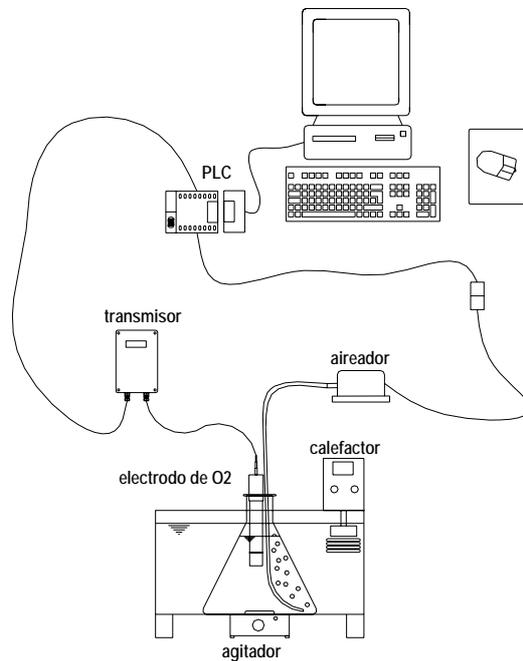


Figura 5.1. Esquema del sistema de medición de OUR.

5.3.3.b Procedimientos matemáticos

Cálculo de OUR

La velocidad de consumo de oxígeno en un reactor aerobio con lodos activos, resulta de la suma del proceso de respiración endógena y de la velocidad de consumo de oxígeno para la oxidación de la materia orgánica fácilmente biodegradable. Mientras que esta última varía dependiendo de la carga introducida, la respiración endógena es independiente.

La determinación de la velocidad de consumo de oxígeno se realiza mediante el cálculo de las pendientes en la etapa de consumo de oxígeno, en base a un balance de masa de oxígeno en el medio de reacción. Si se opera en un sistema sin aporte ni salida de líquidos, se tiene que la variación de la concentración de oxígeno (OD) en el tiempo es:

$$\frac{dOD}{dt} = K_L a \cdot (OD^* - OD) - OUR \quad (\text{Ec. 6})$$

En condiciones de no aireación y despreciando el posible aporte por difusión desde la atmósfera, se tiene que la disminución de la concentración de oxígeno se debe sólo al metabolismo bacteriano, de manera que:

$$\frac{dOD}{dt} = -OUR \quad (\text{Ec. 7})$$

De esta forma, el valor de OUR se obtiene de las pendientes del gráfico de oxígeno disuelto frente al tiempo. Para una mayor fiabilidad se eliminan los puntos iniciales y finales, se calcula el Índice de Regresión Lineal (r^2) y si éste resulta mayor que 0,95 se acepta el valor de OUR para ese instante.

Cálculo de rendimiento celular de la biomasa heterótrofa, Y

El método respirométrico se puede utilizar para medir parámetros y constantes cinéticas de microorganismos heterótrofos y nitrificantes, como por ejemplo velocidad específica de crecimiento, la constante de saturación de Monod, el rendimiento celular o la velocidad de degradación de sustrato (Cech *et al.*, 1985; Ekama *et al.*, 1986; Kappeler y Gujer, 1992; Kovarova-Kovar y Egli, 1998).

En este caso se utilizó el parámetro de Y ($\text{gDQO}_{\text{biomasa formada}}/\text{gDQO}_{\text{sustrato consumido}}$) para comparar el comportamiento de las corrientes mencionadas (apartado 5.3.3), determinándose por medio de relación derivada a partir de la ecuación de Orhon (Orhon *et al.*, 1995), según la ecuación 8:

$$Y = 1 - \frac{1}{\Delta\text{DQO}_s} \int_0^t \text{OUR} \cdot dt \quad (\text{Ec. 8})$$

De esta manera, el área bajo la curva se obtiene al ajustar la cinética de OUR mediante el software Table Curve 2D, entre el tiempo inicial y final. La variación de DQO soluble (ΔDQO_s) se obtiene de la diferencia entre la medida de DQO inicial y final. Con el fin de expresar el rendimiento en $\text{g}_{\text{SSV}}/\text{gDQO}_{\text{consumido}}$, se utiliza el factor de conversión para la biomasa de 1,42 $\text{g}_{\text{SSV}}/\text{gDQO}$.

Cálculo de la fracción fácilmente biodegradable, S_s

Si bien es cierto, en general el contenido de un agua residual se puede clasificar en particulado, coloidal y soluble, resulta conveniente distinguir la biodegradabilidad de cada fracción, proporcionando así una caracterización más completa. De esta manera, según Vollertsen y Hvitved-Jacobsen (2002), la caracterización de un sustrato expresado como DQO está conformada por las siguientes fracciones: DQO fácilmente biodegradable, DQO fácilmente hidrolizable, DQO difícilmente hidrolizable y DQO recalcitrante. El valor de las distintas fracciones se puede obtener de forma gráfica a partir de un respirograma construido a partir de la medida de OUR. Un método más sencillo fue propuesto por Kappeler y Gujer (1992) en el cual se plantea que el sustrato fácilmente biodegradable (S_s) engloba al DQO fácilmente biodegradable y el fácilmente hidrolizable, mencionados anteriormente. La fracción de DQO fácilmente biodegradable estaría relacionada con la cantidad de oxígeno utilizada en el consumo de dicha DQO y consecuentemente sería proporcional al área entre el nivel alto de OUR y la línea horizontal proyectada al eje vertical al nivel de la segunda meseta de OUR, como se indica en la Figura 5.2. El área bajo esta línea horizontal corresponde a la respiración endógena.

La fracción de sustrato fácilmente biodegradable se compone de compuestos que se degradan rápidamente y, por lo tanto, provocan una respuesta respirométrica

rápida. La prueba estándar para la determinación de la Ss implica la adición de una muestra del agua residual al lodo, midiendo la OUR hasta que vuelve al nivel endógeno, obteniendo una curva como la presentada en la Figura 5.2 (Ros *et al.*, 1988; Spanjers *et al.*, 1993; Xu y Hasselblad, 1996).

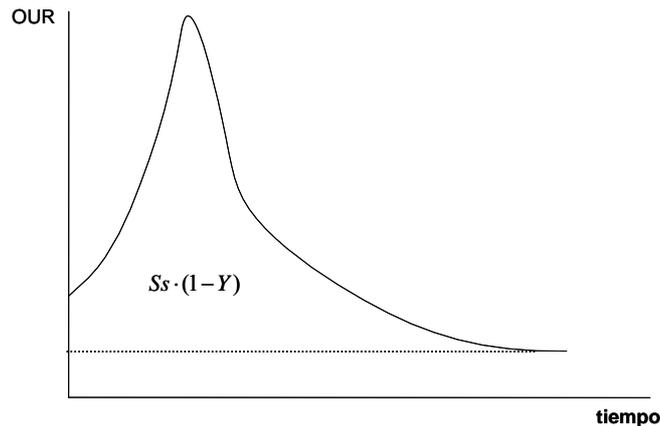


Figura 5.2. Gráfico de Kappeler y Gujer para la determinación de la fracción de sustrato fácilmente biodegradable de un agua residual.

Esta simplificación permite determinar el valor de sustrato fácilmente biodegradable presente en el agua residual (Ss) mediante la ecuación 9:

$$S_s = \frac{\int OUR_{total} - \int OUR_{endógeno}}{1 - Y} \quad (\text{Ec. 9})$$

En esta ecuación, el área total bajo la curva se obtiene al ajustar la curva de OUR mediante el software Table Curve 2D, entre el tiempo inicial y final. El área correspondiente a la respiración basal se calcula en forma algebraica como el área de un rectángulo.

5.4 Resultados y Discusión

5.4.1 Caracterización del inóculo

Se llevaron a cabo ensayos en discontinuo con la biomasa utilizada como inóculo con el fin de caracterizar el proceso de degradación de gelatina, determinándose su actividad proteolítica ($\text{g}_{\text{gelatina hidrolizada}}/\text{g}_{\text{SSV}} \cdot \text{d}$) a 15°C y 37 °C, tomados como

ejemplo del rango psicrófilo y mesófilo de temperatura. Los resultados se presentan en la Figura 5.3.

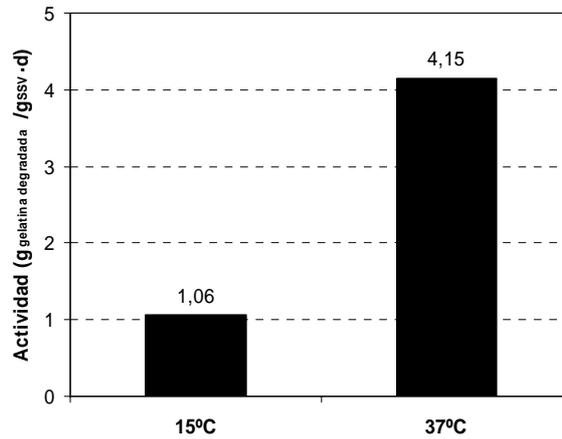


Figura 5.3. Caracterización del lodo anaerobio utilizado como inóculo, en relación al valor de actividad proteolítica a 15°C y 37°C.

Las cinéticas asociadas al proceso de hidrólisis-acidificación de gelatina a baja temperatura se presentan en las Figura 5.4, en donde se observa la desaparición de gelatina, la aparición de amonio y el porcentaje de degradación de la proteína.

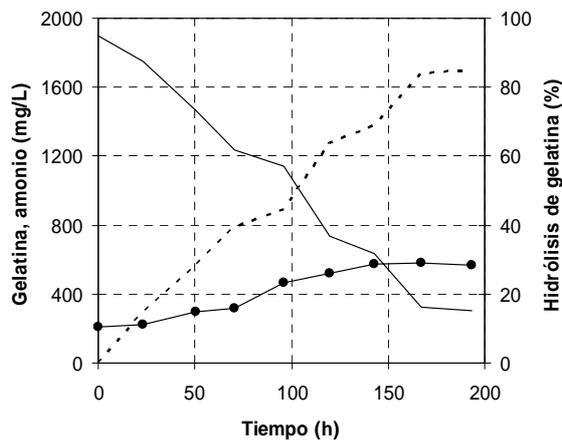


Figura 5.4. Cinética de hidrólisis-acidogénesis de gelatina a 15 °C. Símbolos: Hidrólisis de gelatina (—); generación de amonio (●); porcentaje de degradación de gelatina (---).

En la Figura 5.5 se muestra el balance de nitrógeno en dicho sistema, dado por la desaparición de gelatina y la consiguiente generación de amonio producto de la fermentación de aminoácidos; adicionalmente es posible ver que la concentración de nitrógeno en el medio se mantiene prácticamente constante. Cabe señalar que el porcentaje máximo de degradación alcanzado es cercano al 85%, mientras que a 37°C fue del 90% (datos no presentados).

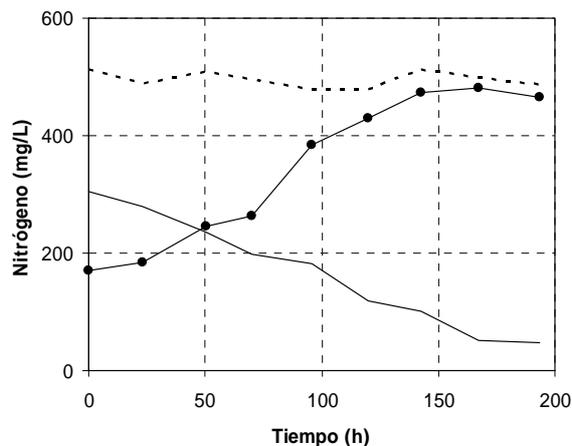


Figura 5.5. Balance de nitrógeno en el proceso de hidrólisis-acidogénesis de gelatina a 15°C. Símbolos: N-gelatina (—); N-amonio (●); nitrógeno total-NTK (---).

Adicionalmente, se llevaron a cabo los mismos ensayos pero utilizando lodo metanogénico con las características señaladas en el punto 3.4.1 del Capítulo 3. Si bien es cierto tanto la cinética de degradación de gelatina como la de generación de amonio son similares a las obtenidas en el caso del lodo no metanogénico, los porcentajes de degradación y las velocidades de hidrólisis son mayores en el caso en que se utiliza lodo metanogénico como inóculo, como se observa en la Figura 5.6. Esto podría deberse a que si bien es cierto los aminoácidos que contiene la gelatina son fermentados principalmente por el mecanismo de Stickland (Ramsay y Pullammanappallil, 2001), en ciertas condiciones deben ser metabolizados por la vía de oxidación anaerobia (McInerney, 1988), para lo que se requiere la presencia de las poblaciones consumidoras de hidrógeno que están ausentes en la biomasa no metanogénica. Tarlera y Stams (1999) estudiaron la degradación de proteínas y aminoácidos con un cultivo puro y en cocultivo con una cepa

metanogénica, determinando que la presencia de bacterias metanogénicas triplica la actividad proteolítica, aumentando la velocidad de hidrólisis de las proteínas y mejorando el proceso de fermentación de aminoácidos. Por otra parte, para ambos tipos de lodos analizados se corrobora el efecto de la temperatura, obteniéndose cinéticas más rápidas en el rango mesófilo de temperatura.

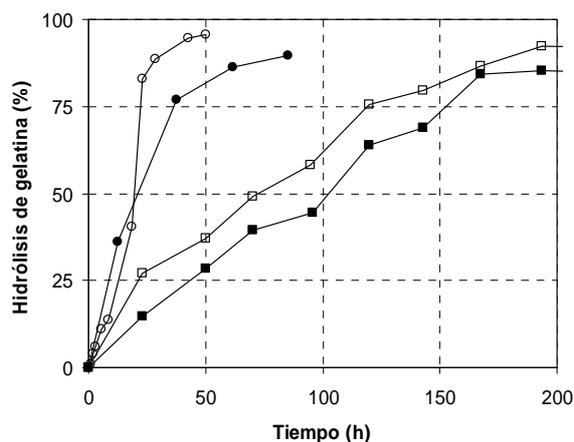


Figura 5.6. Hidrólisis de gelatina a 15 y 37°C utilizando biomasa metanogénica (○ 15°C, ● 37°C) y no-metanogénica (□ 15°C, ■ 37°C).

Para los ensayos en continuo se decidió utilizar la biomasa no-metanogénica como inóculo debido a que el sistema se operaría en condiciones acidogénicas evitando la metanización de los AGV, por lo que las ventajas asociadas a la biomasa metanogénica no podrían ser aprovechadas en dicho caso.

5.4.2 Ensayos en continuo

5.4.2.a Influencia del TRH de operación

El reactor, inoculado con 3 g_{SSV}/L de biomasa no metanogénica, operó durante 234 días, alcanzando al final del estudio una concentración de 4 g_{SSV}/L (con 21% de cenizas). Durante la puesta en marcha del reactor, que se extendió durante 100 días, se produjo la reiterada flotación y lavado de biomasa. Una vez estabilizado el sistema, obteniéndose un efluente clarificado con $0,19 \pm 0,03$ g_{SSV}/L, el reactor operó con TRH de 12, 21 y 36 horas, con el fin de determinar la influencia de

dicho parámetro en el proceso de hidrólisis-acidogénesis de gelatina. La Figura 5.7 muestra los resultados obtenidos para las tres operaciones realizadas, comparando el porcentaje de hidrólisis de la proteína, porcentaje de amonificación (fracción de nitrógeno del efluente que permanece como amonio) y el porcentaje de acidificación (fracción de DQO del efluente que se encuentra en la forma de AGV). El pH del medio se mantuvo en $7,2 \pm 0,1$ producto del efecto tampón dado por la mezcla resultante entre el amonio y AGV formados y el bicarbonato presente en la corriente de alimentación.

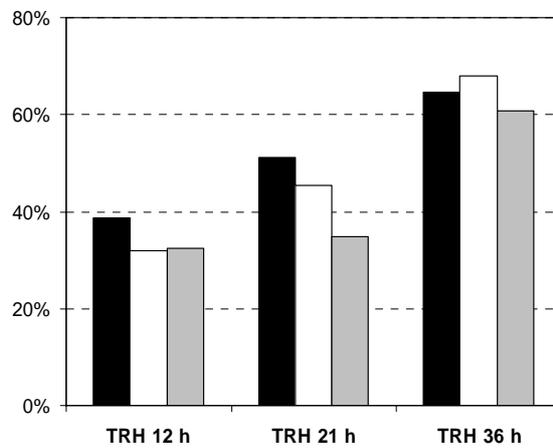


Figura 5.7. Comportamiento del reactor en el proceso de hidrólisis/acidogénesis anaerobia de gelatina a 15°C para TRH de 12, 21 y 36 horas. Símbolos: Hidrólisis de gelatina (negro); amonificación (blanco) y acidificación (gris).

Como se observa, el TRH de operación afecta la eficiencia de degradación de la proteína, de manera que debe existir un compromiso entre la velocidad de producción de las enzimas extracelulares responsables de dicho proceso y la velocidad de dilución del proceso. Ya que las enzimas hidrolíticas son secretadas por los microorganismos, es importante mantener una adecuada cantidad de biomasa en el sistema de manera de poder suplir los requerimientos del catalizador. Sin embargo, a pesar de que el efluente tenía una baja cantidad de sólidos en suspensión, la concentración de biomasa mantenida en el reactor fue de solo 4 g/L, por lo que este parámetro puede ser crítico, limitando la capacidad degradativa del sistema.

Por otro lado, si bien es cierto el incremento del TRH de operación permite mejorar la hidrólisis de la molécula proteica, aumentando también la fracción de nitrógeno que permanece como amonio en la corriente de salida, la acidificación del sustrato no se ve incrementada de la misma forma al modificar dicho parámetro, de manera que el aumento del TRH desde 12 a 21 horas no parece afectar este parámetro. A pesar que esto podría indicar la metabolización de los ácidos grasos hacia la generación de metano al operar con TRH más altos, por un lado el balance de DQO indicó que entre el 91 y 97 del DQO permanece en el efluente del reactor, y por otro lado la operación con TRH de 36 horas revirtió la tendencia descrita.

La variación en el TRH de operación también modificó, aunque levemente, la composición de la mezcla de AGV formada, según se desprende de la Figura 5.8.

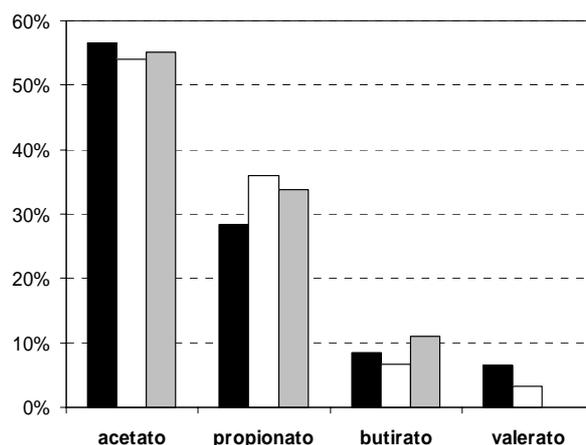


Figura 5.8. Composición de la mezcla de AGV obtenida en el proceso para TRH de operación de 12 (negro), 21 (blanco) y 36 horas (gris).

En ella se observa el incremento de la fracción de propionato y butirato y la desaparición del valerato al aumentar el TRH de operación. El acetato representa el principal aporte a la mezcla de AGV, manteniéndose aproximadamente constante en 55% para los tres TRH de operación. De acuerdo a las reacciones de metabolización recopiladas por Ramsay y Pullammanappallil (2001) y a la composición aminoacídica de la gelatina, se observa que todas las reacciones involucradas proporcionan acetato como producto y sólo en dos casos se forma

valérico, lo que está en concordancia con los resultados, aunque la distribución de AGV obtenida puede estar afectada por reacciones de acetogénesis.

En la Tabla 5.2 se resume la relación molar entre los componentes de la mezcla de AGV formada en los tres TRH de operación, comparándose con la distribución asumida por Angelidaki *et al* (1999) para la fermentación termófila de gelatina (ver Ec. 5). Según se observa, la proporción de amonio y propionato formada son los que más se desvían de los valores predichos por el modelo, siendo bastante ajustadas las predicciones para butirato y valerato. La mayor proporción de amonio presente en el efluente puede estar relacionada con el bajo crecimiento de biomasa obtenido.

Tabla 5.2. Relación molar entre los componentes de la mezcla de AGV formada en el proceso de degradación de gelatina.

	acetato	propionato	butirato	valerato	amonio
Angelidaki <i>et al</i> (1999)	1	0,098	0,077	0,044	0,951
TRH 12 h	1	0,315	0,073	0,035	1,494
TRH 21 h	1	0,212	0,01	0,034	1,763
TRH 36 h	1	0,360	0,079	0	1,548

La influencia del TRH en el proceso de hidrólisis de proteínas también es reportado por Guerrero *et al.* (1999), estudiando la degradación de un agua residual proveniente de la industria alimentaria con elevado contenido de sólidos y proteína. En dicho estudio, realizado a 37°C, se alcanzó una degradación del 77% para un TRH de operación de 24 h, eficiencia que cae al 41% al operar con TRH de 6 horas. Por otra parte, al operar en condiciones termófilas (55°C), el efecto del TRH se suaviza, obteniéndose al menos un 61% de degradación para el TRH mas bajo.

Los resultados presentados hasta el momento manifiestan las dificultades asociadas al proceso de degradación de una macromolécula compleja de tipo proteico, como es el caso de la gelatina, al operar en el rango psicrófilo de temperatura.

Adicionalmente, se realizó el fraccionamiento por tamaño molecular de la alimentación y efluente obtenido para cada TRH ensayado. Los resultados se presentan en la Figura 5.9. La caracterización de la alimentación determinó que el 40% de la DQO corresponde a moléculas de tamaño mayor que 10 kDa, manteniendo una fracción similar en forma soluble (menor que 1 kDa). La elevada solubilización del sustrato se debe a su bajo valor bloom (80-100), dado por la hidrólisis sufrida por la molécula en el proceso de producción. El valor bloom es una medida de la firmeza y el poder gelificante de la gelatina, de manera que a mayor bloom mayor peso molecular. El valor bloom habitual de las gelatinas suele fluctuar entre 50 y 250 (GME-Gelatine Manufacturers of Europe, 2005), correspondiendo el rango 80-100 bloom a un peso molecular aproximado de 20-25 kDa.

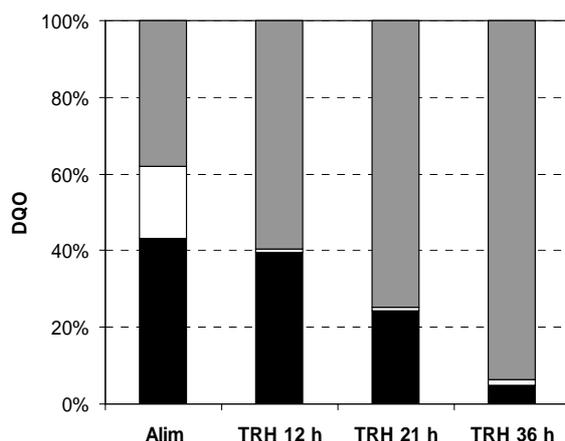


Figura 5.9. Distribución de tamaños moleculares de la alimentación y salida del reactor operado a TRH de 12, 21 y 36 horas. Símbolos: >10 kDa (negro); 10-1 kDa (blanco); < 1 kDa (gris).

De acuerdo a la figura, el incremento del TRH mejora la hidrólisis de la fracción de tamaño molecular mayor que 10 kDa. En el caso de la operación con el menor TRH (12 horas) es posible degradar sólo la fracción intermedia (1-10 kDa), permaneciendo inalterada la fracción mayor que 10 kDa. El incremento del TRH a 21 horas permitió reducir esta fracción difícil de degradar, mientras que en la operación con el TRH de 36 horas, se obtuvo un efluente altamente solubilizado,

con casi el 94% de la DQO aportado por moléculas de tamaño inferior a 1 kDa y sólo un 5% de moléculas en la fracción de mayor tamaño.

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación, con estudios realizados por otros autores, se encuentran diferencias significativas, aún considerando que la mayoría de los trabajos se han llevado a cabo a temperaturas superiores (mesófilo o termófilo), a pH controlado distinto al neutro o con otro sustrato proteico (peptona, caseína). Yu y Fang (2003) estudiaron el efecto de la temperatura y el pH en la hidrólisis de gelatina, encontrando que la menor degradación, cerca de un 60%, se obtenía a pH 4 y 37°C (para temperatura fija y pH variable), mientras que a pH 5,5 y 20°C (pH fijo y temperatura variable) se alcanzaba una degradación de proteína del 90%. Los mismos autores analizan el efecto del TRH utilizando pH 5,5 y 37°C, encontrando que la eficiencia mejora con el incremento de TRH, siendo 24 horas el máximo utilizado (hidrólisis de 90% de la gelatina). Las diferencias encontrados en este trabajo con respecto a los resultados ya revisados de Yu y Fang, permiten postular que el grado de hidrólisis de la gelatina empleada como materia prima podría condicionar la eficiencia de la degradación anaerobia. De esta manera, al analizar los resultados de la Figura 5.9, resulta claro que si el sustrato utilizado tuviera un tamaño molecular predominante menor que 10 kDa la eficiencia de hidrólisis obtenida habría sido mayor.

5.4.2.b Operación con acoplamiento de sistema de UF

Durante la operación con TRH de 12 y 21 horas se incluyó una etapa con acoplamiento de un sistema de UF tangencial con el fin de evaluar su efecto en el proceso de hidrólisis-acidogénesis psicrófila de gelatina. El sistema de UF permite recircular al reactor la corriente de retenido que contiene moléculas de tamaño mayor que 10 kDa que provienen de la metabolización incompleta de la gelatina. En la Figura 5.10 se muestra el porcentaje de degradación de gelatina alcanzado en las fases sin y con acoplamiento del sistema de UF durante la operación del reactor. Según se observa, la inclusión de un sistema de UF eleva la degradación de la proteína hasta cerca de un 90% para los dos TRH ensayados. La amonificación y acidificación obtenidas en cada caso se resumen en la Figura 5.11, en donde a modo comparativo se han incluido los resultados

correspondientes a la operación sin acoplamiento de UF. Al igual que para el caso de la hidrólisis de la proteína, los resultados presentados muestran un incremento importante en ambos parámetros, similar para las dos condiciones ensayadas.

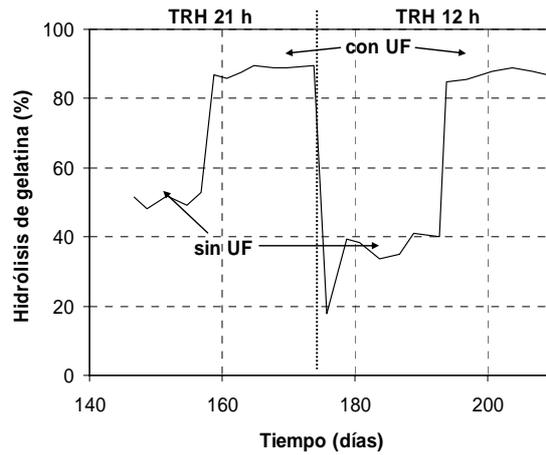


Figura 5.10. Porcentaje de hidrólisis de gelatina alcanzado en la operación del reactor con TRH de 12 y 21, sin y con acoplamiento del sistema de UF tangencial.

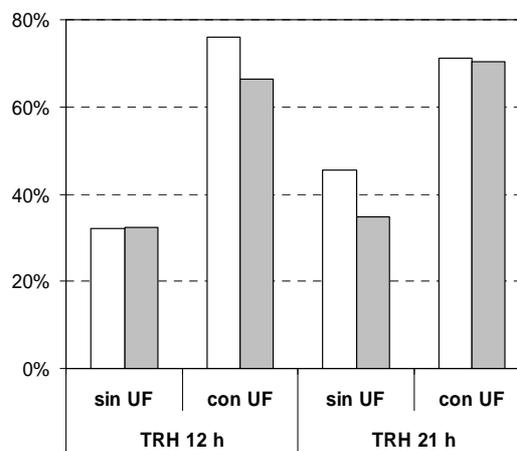


Figura 5.11. Comportamiento del reactor en el proceso de hidrólisis/acidogénesis anaerobia de gelatina a 15°C para TRH de 12 y 21, sin y con acoplamiento de un sistema de UF tangencial. Símbolos: amonificación (blanco) y acidificación (gris).

El análisis del tamaño molecular de las corrientes involucradas en la operación con acoplamiento del sistema de UF tangencial se muestra en la Figura 5.12. En ella se ha incluido la alimentación al sistema, la salida del reactor y la salida del sistema de UF (filtrado), de acuerdo a la figura 3.6.

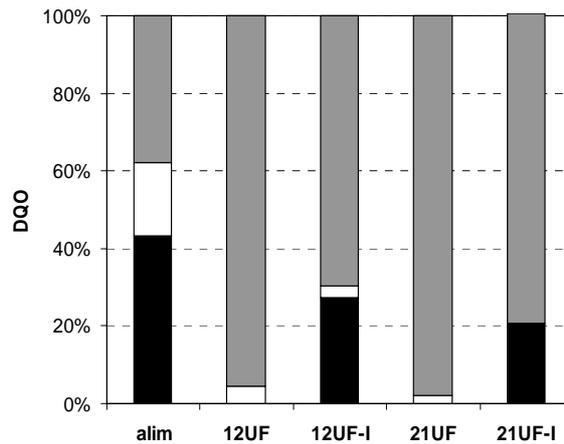


Figura 5.12. Fraccionamiento por tamaño molecular de la alimentación (alim) , salida del reactor (12UF-I, 21UF-I) y salida del sistema (12UF, 21UF) durante la operación con acoplamiento del sistema de UF tangencial con TRH de 12 y 21 horas. Símbolos: >10 kDa (gris); 10-1 kDa (blanco); <1 kDa (negro).

De acuerdo a los resultados presentados en la figura, se aprecia que el sistema de UF permite obtener un efluente con un 95-98% de moléculas de tamaño menor que 1 kDa, acumulándose una fracción reducida de moléculas de tamaño intermedio (1-10 kDa). El fraccionamiento obtenido correspondiente a la salida del reactor (previo a la entrada al sistema de UF), muestra la eficiencia del reactor y la estabilidad del sistema, pues al comparar esta situación con la salida del reactor sin acoplamiento de UF para el mismo TRH (ver Figura 5.9) se observa que la fracción de mayor tamaño, disminuye de 40 a 28%, para TRH de 12 horas y de 24 a 20% para TRH de 21 horas. De la misma forma, se incrementa la fracción soluble en ambos casos. De esta manera, aún sería posible aumentar el flujo de retenido recirculado al reactor con el fin de aumentar la capacidad de degradación del sistema.

5.4.3 Caracterización de la biomasa adaptada a la degradación de gelatina.

Al finalizar la operación del reactor, que se extendió por 234 días, se llevó a cabo un ensayo en batch de hidrólisis de gelatina a 15°C utilizando la biomasa desarrollada con el fin de determinar su grado de adaptación a la degradación de proteínas en sistemas psicrófilos. Para ello se utilizó la metodología descrita en el apartado 6.3.1. El resultado se muestra en la Figura 5.13, la cual incluye con fines comparativos la actividad proteolítica determinada al inóculo utilizado al inicio de la operación del reactor.

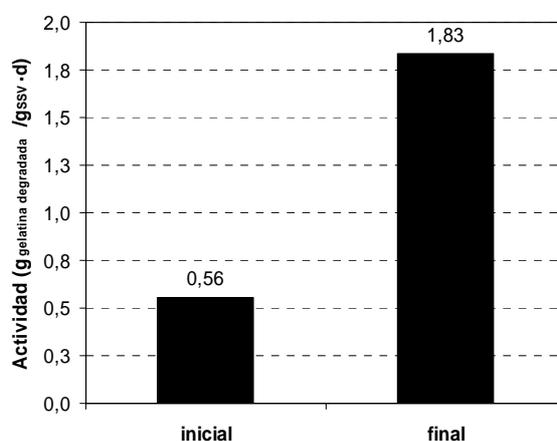


Figura 5.13. Actividad proteolítica a 15°C del inóculo y de la biomasa adaptada a la degradación de gelatina a baja temperatura.

Según se desprende de los resultados mostrados, la biomasa desarrollada durante la operación del reactor incrementó su capacidad proteolítica a baja temperatura en un 180%, aproximadamente.

5.4.4 Análisis de biodegradabilidad por medio de la medida de OUR

En esta sección se evaluó, por medio de la técnica de OUR, la ventaja de utilizar un sistema de degradación anaerobia para llevar a cabo la hidrólisis de macromoléculas de elevado peso molecular, como tratamiento previo a un proceso convencional de lodos activos. Para ello se obtuvieron los respirogramas

de la alimentación y de los efluentes de la operación con TRH de 12 horas sin y acoplamiento de un sistema de UF. El resultado se muestra en la Figura 5.14 para una F/M de 3 (exceso de sustrato). Una respuesta similar fue obtenida al llevar a cabo el ensayo con una F/M de 0,5 si bien en ese caso las cinéticas fueron más rápidas ya que se opera con exceso de biomasa.

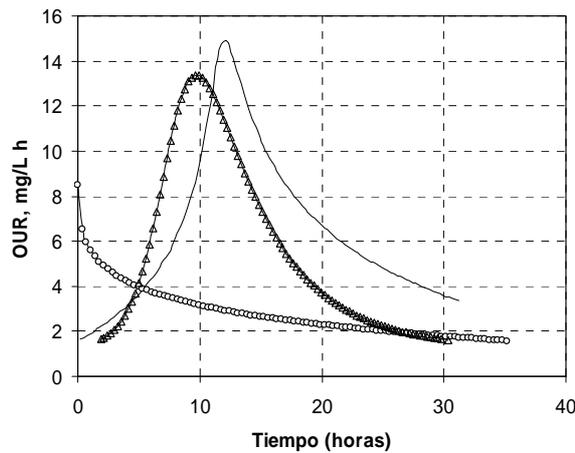


Figura 5.14. Resumen de los perfiles de OUR obtenidos para los efluentes estudiados (F/M=3). Símbolos: alimentación (—), efluente sin UF (Δ), efluente con UF (\circ).

De la figura se observa que los efluentes menos complejos se degradan más rápidamente de manera que la biodegradabilidad de los efluentes sería inversamente proporcional al tiempo en que se presenta el máximo de OUR (para la misma DQO inicial y la relación F/M), hecho que se verá confirmado al analizar los parámetros presentados más adelante. Por otro lado, se aprecia que las cinéticas de degradación aerobia de la alimentación y del efluente sin UF del tratamiento de hidrólisis no semejantes, mientras que la del efluente con UF se asemeja a la curva típica obtenida al utilizar acetato como sustrato, coincidiendo con el análisis por fraccionamiento de tamaño molecular que indicó que cerca del 90% de las moléculas tienen un tamaño menor que 1 kDa (ver Figura 5.12).

A partir de los respirogramas obtenidos se calculan los parámetros de comparación más relevantes, Y (F/M=3) y S_s (F/M=0,5), siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.3.3.b. El cálculo de dichos parámetros se

basa en suponer que para las relaciones iniciales entre DQO y SSV en que se hace el ensayo, en la etapa inicial de crecimiento exponencial del proceso discontinuo existe exceso de sustrato y de oxígeno. Los resultados se presentan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Comparación de parámetros estimados por el método de OUR.

Parámetro	Alimentación	Efluente sin UF	Efluente con UF
Y, g _{SSV} /g _{DQO}	0,36	0,40	0,55
Ss, %	25,7	41,7	52,5

Los resultados obtenidos demuestran que el utilizar un proceso de hidrólisis anaerobio como pretratamiento a un sistema aerobio aumenta en cerca de un 62% la biodegradabilidad del efluente. Por otra parte, el acoplamiento de un sistema de UF permite duplicar la fracción de DQO fácilmente biodegradable a partir de un porcentaje inicial del 26% para la alimentación, lo que repercutirá principalmente en una mayor velocidad de degradación. También se observa asociado a estos incrementos, un aumento en el coeficiente de rendimiento celular debido a la degradación de las moléculas más complejas.

5.5 Conclusiones

Los resultados presentados determinan que en condiciones psicrófilas la hidrólisis anaerobia de gelatina de 80-100 blooms en un reactor RCTA a un TRH de 12 h y pH ~7, no se completa eficazmente, obteniendo un efluente con cerca del 60% de componentes de tamaño molecular menor que 1 kDa, aunque la fracción mayor que 10 kDa es similar a la de la alimentación, indicativo de su lenta biodegradabilidad. El porcentaje de hidrólisis en este caso alcanza el 40% y la acidificación el 30%.

El aumento del TRH hasta 36 horas permite mejorar la eficiencia del sistema, obteniendo un efluente con casi el 95% de moléculas de tamaño menor que 1 kDa, aunque el porcentaje de hidrólisis sigue siendo moderado (en torno al 65%), lo que indica la presencia de péptidos de bajo peso molecular. En esta etapa de la operación la acidificación se eleva a un 60%.

El tratamiento en un reactor de membrana mejora sustancialmente los resultados obtenidos al permitir aumentar el tiempo de residencia de las moléculas no hidrolizadas, de manera que se obtiene un efluente con prácticamente la totalidad moléculas de tamaño menor que 1 kDa.

Por otro lado, los ensayos de OUR realizados con los efluentes de la operación con un TRH de 12 horas, establecen que la utilización de un sistema anaerobio como tratamiento previo a un sistema convencional de lodos activos permite aumentar la fracción fácilmente biodegradable en un 62% para el caso del efluente del sistema sin UF y duplicarlo al acoplar el sistema de UF, en comparación con la alimentación sin tratar.

5.6 Referencias

- Angelidaki, I., Ellegaard, L. and Ahring, B.K. (1999) A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnology and Bioengineering*, **63** (3), 363-372.
- Breure, A.M., Mooijman, K.A. and van Andel, J.G. (1986) Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **24**, 426-431.
- Cech, J.S., Chudoba, J. and Grau, P. (1985) Determination of kinetic constants of activated sludge microorganisms. *Water Science and Technology*, **17** (2-3), 259-272.
- Eastman, J.A. and Ferguson, J.F. (1981) Solubilization of particulate organic-carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *Journal Water Pollution Control Federation*, **53** (3), 352-366.
- Ekama, G.A., Dold, P.L. and Marais, G.V. (1986) Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth-rate of heterotrophs in activated sludge systems. *Water Science and Technology*, **18** (6), 91-114.
- Fang, H.H.P. and Chung, D.W.C. (1999) Anaerobic treatment of proteinaceous wastewater under mesophilic and thermophilic conditions. *Water Science and Technology*, **40** (1), 77-84.
- Fang, H.H.P. and Yu, H.Q. (2002) Mesophilic acidification of gelatinaceous wastewater. *Journal of Biotechnology*, **93** (2), 99-108.
- Frankin, R.J. (2001) Full-scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewater. *Water Science and Technology*, **44** (8), 1-6.
- Fuchs, W., Binder, H., Mavrias, G. and Braun, R. (2003) Anaerobic treatment of wastewater with high organic content using a stirred tank reactor coupled with a membrane filtration unit. *Water Research*, **37** (4), 902-908.

- Ginestet,P., Maisonnier,A. and Sperandio,M. (2002) Wastewater COD characterization: biodegradability of physico-chemical fractions. *Water Science and Technology*, **45** (6), 89-97.
- GME-Gelatine Manufacturers of Europe. 22-7-2005. *Todo sobre la gelatina*. Disponible desde Internet en: <http://www.gelatine.org>. Con acceso el 22-7-2005.
- Gounot,A.M. (1986) Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia*, **42** (11-12), 1192-1197.
- Guerrero,L., Omil,F., Mendez,R. and Lema,J.M. (1999) Anaerobic hydrolysis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. *Water Research*, **33** (15), 3281-3290.
- Kappeler,J. and Gujer,W. (1992) Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Science and Technology*, **25** (6), 125-139.
- Kovarova-Kovar,K. and Egli,T. (1998) Growth kinetics of suspended microbial cells: From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62** (3), 646-+.
- Lettinga,G. and Pol,L.W.H. (1991) UASB-process design for various types of wastewaters. *Water Science and Technology*, **24** (8), 87-107.
- Lettinga,G., Rebac,S. and Zeeman,G. (2001) Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, **19** (9), 363-370.
- Levine,A.D., Tchobanoglous,G. and Asano,T. (1985) Characterization of the size distribution of contaminants in wastewater: treatment and reuse implications. *Journal Water Pollution Control Federation*, **57** (7), 805-816.
- Logan,B.E. and Jiang,Q. (1990) A model for determining molecular size distributions of DOM. *Journal of Environmental Engineering*, **116**, 1046-1062.
- Mahmoud,N., Zeeman,G., Gijzen,H. and Lettinga,G. (2003) Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. *Bioresource Technology*, **90** (1), 1-9.
- Marani,D., Renzi,V., Ramadori,R. and Braguglia,C.M. (2004) Size fractionation of COD in urban wastewater from a combined sewer system. *Water Science and Technology*, **50** (12), 79-86.
- McInerney,M.J. (1988) *Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins*. In: *Biology of Anaerobic Microorganism*. Zehnder,A.J. (ed), pp. 373-415, John Willey and Sons, Inc., New York.
- Metcalf and Eddy (1996) *Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, vertido y utilización*. Mc Graw-Hill, Madrid.
- Nagase,M. and Matsuo,T. (1982) Interactions between aminoacid degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering*, **24** (10), 2227-2239.

- Nedwell,D.B. (1999) Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *Fems Microbiology Ecology*, **30** (2), 101-111.
- Nisman,B. (1954) The Stickland reaction. *Bacteriological Reviews*, **18** (1), 16-42.
- Orhon,D., Yildiz,G., Cokgor,E.U. and Sozen,S. (1995) Respirometric evaluation of the biodegradability of confectionary wastewaters. *Water Science and Technology*, **32** (12), 11-19.
- Pol,L.H. and Lettinga,G. (1986) New technologies for anaerobic wastewater treatment. *Water Science and Technology*, **18** (12), 41-53.
- Ramsay,I.R. and Pullammanappallil,P.C. (2001) Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, **12** (4), 247-257.
- Ros,M., Dular,M. and Farkas,P.A. (1988) Measurement of respiration of activated sludge. *Water Research*, **22** (11), 1405-1411.
- Spanjers,H., Olsson,G. and Klapwijk,A. (1993) Determining influent short-term biochemical oxygen-demand by combined respirometry and estimation. *Water Science and Technology*, **28** (11-12), 401-414.
- Spanjers,H., Vanrolleghem,P., Nguyen,K., Vanhooren,H. and Patry,G.G. (1998) Towards a simulation-benchmark for evaluating respirometry-based control strategies. *Water Science and Technology*, **37** (12), 219-226.
- Tarlera,S. and Stams,A.J.M. (1999) Degradation of proteins and amino acids by *Caloramator proteoclasticus* in pure culture and in coculture with *Methanobacterium thermoformicum* Z245. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53** (1), 133-138.
- Vollertsen,J. and Hvitved-Jacobsen,T. (2002) Biodegradability of wastewater - a method for COD-fractionation. *Water Science and Technology*, **45** (3), 25-34.
- Xu,S.L. and Hasselblad,S. (1996) A simple biological method to estimate the readily biodegradable organic matter in wastewater. *Water Research*, **30** (4), 1023-1025.
- Yu,H.Q. and Fang,H.H.P. (2003) Acidogenesis of gelatin-rich wastewater in an upflow anaerobic reactor: influence of pH and temperature. *Water Research*, **37** (1), 55-66.

CAPÍTULO SEXTO

Desarrollo de agregados bacterianos en el proceso de hidrólisis/acidogénesis psicrófila

RESUMEN

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo es caracterizar la biomasa desarrollada en los ensayos descritos en los Capítulos 3 y 4 para la operación con almidón como fuente de carbono, y el Capítulo 5, para los experimentos con gelatina como fuente de carbono y nitrógeno.

En el primer caso, la biomasa forma agregados estables, de buena sedimentabilidad, durante la operación en un reactor de lecho ascendente, al metabolizar una alimentación con déficit de nitrógeno cuando la alimentación contiene calcio. Esta biomasa, no metanogénica, posee una elevada actividad hidrolítica y acidogénica, por lo que es capaz de degradar eficientemente almidón de alto peso molecular, operando en el rango psicrófilo de temperatura.

En el caso de la operación con gelatina, se observan agregados, de menor tamaño que los formados en la operación con almidón, mezclados con flóculos de gran tamaño de apariencia más o menos compacta. El efecto beneficioso de la adición de calcio en la alimentación se corroboró ya que este tipo de lodo también presenta una buena sedimentabilidad, caracterizada por un IVL bajo.

La biomasa agregada presentó una relación proteína/azúcares totales en los EPS próxima a la unidad, observándose valores muy superiores en la biomasa no agregada, de modo que este parámetro sería adecuado para caracterizar el estado de agregación de la biomasa anaerobia. Adicionalmente, la agregación bacteriana estaría relacionada con el incremento del contenido de azúcares totales en los EPS, mientras que este fenómeno no se produciría si ocurre un aumento del contenido de material proteico.

INDICE

6.1	INTRODUCCIÓN	6-3
6.2	OBJETIVOS	6-5
6.3	MATERIALES Y MÉTODOS	6-5
6.3.1	<i>Operación con almidón</i>	6-5
6.3.2	<i>Operación con gelatina</i>	6-5
6.3.3	<i>Análisis de la biomasa</i>	6-6
6.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6-8
6.4.1	<i>Operación con almidón</i>	6-8
6.4.2	<i>Operación con gelatina</i>	6-18
6.5	CONCLUSIONES	6-23
6.6	REFERENCIAS	6-23

6.1 Introducción

El fenómeno de granulación es la resultante de un proceso de auto-inmovilización bacteriana y, consecuentemente, de la formación y crecimiento de agregados. Diversas teorías ampliamente descritas por Liu *et al.* (2002) y más recientemente por Pol *et al.* (2004), entre otros, buscan explicar este proceso, siendo una de las más aceptadas la de la presión de selección que indica que bajo ciertas condiciones estresantes impuestas al lodo (de tipo biológica o física) tiene lugar un proceso de selección microbiana, de manera que la biomasa se enriquece en microorganismos capaces de formar agregados con alta capacidad de sedimentación en competencia con los que se encuentran dispersos o agregados difusamente, resultando eventualmente en gránulos (Vieira *et al.*, 2001).

Este mecanismo de asociación bacteriana ha sido el soporte de la expansión y consolidación de la tecnología anaerobia en los últimos 25 años, debido al desarrollo de reactores de segunda y tercera generación, cuya eficiencia depende en gran medida del desarrollo de biomasa granular, lo que permite operar con alta retención de biomasa, prescindiendo de un equipo de sedimentación, y por consiguiente tratar altas cargas orgánicas, reduciendo el volumen de reactor requerido y los costos asociados. Hoy en día existen más de 2000 reactores anaerobios de alta carga a escala industrial, demostrando ser una tecnología altamente competitiva en variadas situaciones y para muchos tipos de residuos líquidos industriales (Alves *et al.*, 2000; Frankin, 2001; Jeong *et al.*, 2005).

Si bien el proceso de autoinmovilización bacteriana en sistemas anaerobios ha sido ampliamente discutido en los últimos años (Skiadas *et al.*, 2003; Pol *et al.*, 2004; Liu y Tay, 2004), el mecanismo de agregación aún no ha sido clarificado totalmente, existiendo una serie de teorías al respecto que se pueden clasificar en físicas, microbiológicas y termodinámicas (Dolfing, 1986; McLeod *et al.*, 1990; Chen y Lun, 1993; Tay *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004a; Liu *et al.*, 2004b), siendo muy probable que el proceso se deba a un conjunto de mecanismos que dependerán de las condiciones de operación y del tipo de biomasa involucrada.

Se han identificado una serie de factores que afectan el proceso de granulación entre los que se cuentan aspectos operacionales como la velocidad ascensional y

el tiempo de retención, de manera que en la operación con TRH altos acompañados de una baja velocidad ascensional se tiende a desarrollar biomasa dispersa, mientras que la operación con TRH pequeños, unido a una velocidad ascensional elevada, favorece el proceso de granulación al promover el lavado de biomasa no competitiva (Liu *et al.*, 2002).

La composición del agua residual también parece afectar al proceso de agregación y a la estructura del gránulo formado (Fang *et al.*, 1994; Fukuzaki *et al.*, 1995; O'Flaherty *et al.*, 1997). Así, se ha visto que la presencia de carbohidratos sustenta el desarrollo de la biomasa acidogénica y facilita la formación de EPS (substancias poliméricas extracelulares), material secretado por las células en condiciones de stress como por ejemplo la limitación en la fuente de nitrógeno, altos esfuerzos de corte o alternancia de periodos de alimentación (Liu *et al.*, 2004b); y que juega un papel preponderante en las propiedades físicas y estructurales de los agregados bacterianos (Sutherland, 2001). Por otra parte, los gránulos formados en procesos de tratamiento de aguas residuales con alto contenido proteico muestran una baja sedimentabilidad y resistencia estructural (Batstone y Keller, 2001).

Debido a que se ha visto que uno de los factores importantes para el desarrollo de biomasa granular a partir de biomasa dispersa es la presencia de núcleos o portadores, se han llevado a cabo diversas investigaciones con el fin de mejorar/acelerar el proceso de agregación bacteriana a partir de dicho principio, entre los que se cuentan el empleo de polímeros naturales o sintéticos con capacidad floculante (El-Mamouni *et al.*, 1998; Kalogo *et al.*, 2001; Uyanik *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2005) y de iones metálicos como calcio, fierro y aluminio (Yu *et al.*, 2001a; Yu *et al.*, 2001b; Jiang *et al.*, 2003), que pueden unir las células cargadas negativamente formando núcleos microbianos.

Generalmente el proceso de agregación de microorganismos anaerobios se ha llevado a cabo principalmente en reactores UASB, aunque también han sido reportados algunos trabajos en otros tipos de reactores. Entre ellos destaca el de Vanderhaegen *et al.* (1992) en un reactor RCTA en donde se observa la desaparición de biomasa de forma granular tras operar el reactor sin agitación durante tres semanas, poniendo en duda la necesidad de contar con un flujo

ascendente para el desarrollo de los agregados bacterianos. Otros trabajos se han llevado a cabo en reactores de recirculación interna-IC (Pereboom y Vereijken, 1994), de lecho migrante-AMBR (Angenent y Sung, 2001), secuencial anaerobio-ASBR (Wirtz y Dague, 1997) y EGSB (Gonzalez-Gil *et al.*, 2001). A pesar de que estos últimos son clasificados más como reactores de biofilm que como granulares, existe la tendencia a considerar que los agregados bacterianos son biofilm esféricos en donde las bacterias se autoinmovilizan en ausencia de un material de soporte.

Finalmente, a pesar de que la casi totalidad de las investigaciones en el campo anaerobio se han centrado en el desarrollo de biomasa granular metanogénica y a que existe evidencia que establece que la formación del núcleo está impulsado por la presencia de bacterias metanogénicas y sintróficas (Chen y Lun, 1993; Fang *et al.*, 1994; El-Mamouni *et al.*, 1997), aisladamente se ha reportado el fenómeno de agregación de biomasa anaerobia acidogénica (Vanderhaegen *et al.*, 1992; Liu y Fang, 2003), denitrificante (Tarre *et al.*, 1994) y productora de hidrógeno (Fang *et al.*, 2002), ninguna de ellos en procesos a baja temperatura.

6.2 Objetivos

En el presente capítulo se describen las características de la biomasa desarrollada durante el proceso psicrófilo de degradación anaerobia de almidón y gelatina llevado a cabo por biomasa acidogénica.

6.3 Materiales y Métodos

6.3.1 Operación con almidón

La biomasa analizada corresponde a la desarrollada durante la operación del reactor descrita en los Capítulos 3 y 4.

6.3.2 Operación con gelatina

La biomasa analizada corresponde a la desarrollada durante la operación del reactor descrita en el Capítulo 5.

6.3.3 Análisis de la biomasa

En base a los antecedentes reportados en literatura los agregados de biomasa tanto aerobios como anaerobios se caracterizan tradicionalmente en base a los siguientes parámetros: composición microbiana, densidad y tamaño de los agregados, carga superficial coloidal, hidrofobicidad, sedimentabilidad y contenido y composición de EPS. En este capítulo, la biomasa fue analizada considerando los parámetros de EPS, índice volumétrico de lodos (IVL) y velocidad de sedimentación. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis fotográfico con el fin de comparar visualmente la biomasa desarrollada en las distintas condiciones de operación y la biomasa metanogénica granular utilizada como inóculo al inicio de la investigación.

6.3.3.a EPS

Se han desarrollado variados métodos para extraer y caracterizar los EPS, entre los que se cuentan: tratamiento alcalino (Sato y Ose, 1985), calor o aplicación de vapor (Wallen y Davis, 1972), centrifugación (Brown y Lester, 1980), extracción con etanol (Forster y Clarke, 1983), resina catiónica (Frölund *et al.*, 1996), etc. Varios autores han comparado las eficiencias de dichos métodos trabajando con biofilms (Azeredo *et al.*, 2003) o lodos activos (Brown y Lester, 1980), encontrándose grandes diferencias en los resultados obtenidos, lo que indica que no existe un método universal y aún se debe trabajar en la estandarización de la metodología. Por otro lado, muchos de los métodos mencionados han sido cuestionados debido a que su agresividad provoca una lisis celular en mayor o menor extensión. En la presente investigación se utilizó la metodología propuesta por Frölund *et al.* (1996), originalmente aplicada a lodos activos, que ha sido mencionada reiteradamente en las investigaciones en los últimos años debido a que causa menos lisis celular que otros métodos. La extracción por resina catiónica combina la acción química con la acción mecánica. De esta manera, en primer lugar se produce la solubilización de los EPS al liberar los cationes que mantienen los polímeros unidos intercambiando el calcio por sodio (en este caso), y por otra parte la agitación mecánica provoca el contacto entre el lodo y la resina induciendo un esfuerzo de corte importante, mejorando el proceso de extracción de los EPS (Batstone y Keller, 2001).

La metodología es la siguiente:

Se resuspende una cierta cantidad de lodo en una solución buffer (2mM Na₃PO₄, 4mM NaH₂PO₄, 9mM NaCl y 1mM KCl) para obtener una concentración final de 3-4 g_{SSV}/L. Si el lodo es granular, previamente es molido suavemente dentro de una bolsa de plástico hasta formar una pasta. La mezcla de lodo y buffer es introducida en una botella de vidrio y se añade la resina Dowex 50_8 20-50 mesh en la forma sódica (Fluka) previamente lavada con buffer a una razón de 70 g_{resina}/g_{SSV}. Se tapa herméticamente la botella y se agita a 700 rpm a 4°C durante 36-40 horas. Este tiempo fue determinado previamente por medio del seguimiento de DQO del sobrenadante, previamente centrifugado a 12.000 x g durante 15 minutos, hasta alcanzar un máximo.

El sobrenadante fue analizado determinando la concentración de carbohidratos por el método del fenol-sulfúrico descrito en el apartado 2.3.1.a y la concentración de proteínas por el método de Lowry (apartado 2.3.1.c).

6.3.3.b Índice volumétrico de lodos (IVL)

La compresibilidad de las muestras de lodos obtenidas en las diversas etapas de operación del reactor se determinó por medio del parámetro de IVL. Para ello se determinó el volumen sedimentado de una muestra de lodo en 30 minutos, de acuerdo al procedimiento descrito en el Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF, 1998), utilizando una probeta graduada. La concentración de biomasa en la mezcla estuvo siempre en el rango 2100±300 mg/L según lo recomendado por Lovett *et al.* (1983) para ensayos con lodos activos.

6.3.3.c Curva de sedimentación

La curva de sedimentación de las muestras de biomasa con distintos estados de agregación se construyó registrando el volumen sedimentado en el tiempo, siguiendo la altura de la capa superior de lodos, de acuerdo al procedimiento del ensayo de IVL descrito anteriormente. El ensayo fue realizado a temperatura ambiente (~25°C).

6.4 Resultados y Discusión

6.4.1 Operación con almidón

La operación del reactor utilizando almidón como sustrato fue presentada en los Capítulos 3 y 4. En el primero se describen diversas configuraciones de reactor y en el segundo distintas razones DQO/N en la alimentación.

Como se señaló en el apartado 3.4.1, el inóculo utilizado al inicio de la operación con almidón fue lodo metanogénico granular (ver Figura 6.1) de color negro característico, el cual progresivamente perdió su apariencia granular, transformándose en un lodo floculento de color marrón claro con mala capacidad de sedimentación, perdiendo además la población metanogénica debido a que la puesta en marcha del sistema se realizó con TRH de 12 y 6 horas en configuración de RCTA. En la Figura 6.2 se muestra la apariencia del lodo acidogénico al cabo de 125 días de operación.



Figura 6.1. Apariencia del lodo metanogénico utilizado como inóculo en la operación del reactor con almidón como sustrato.



Figura 6.2. Lodo acidogénico de apariencia dispersa. Día de operación 125 con TRH de 6 h.

La modificación de la configuración de reactor a lecho ascendente y la operación con sobrecarga de almidón con TRH de 3 horas (ver apartado 3.4.3.c) provocó la agregación de la biomasa acidogénica, mostrando la apariencia presentada en la Figura 6.3. En la Figura 6.4 se muestra la ampliación de un agregado de biomasa acidogénica obtenido al final de la operación del reactor descrita en el Capítulo 3

comparado con la biomasa aún floculenta en la que se aprecian bordes nos definidos.



Figura 6.3. Biomasa desarrollada al cabo de 250 días de operación. TRH 3 horas.



Figura 6.4. Izquierda: flóculo compacto de biomasa acidogénica, 10x. Derecha: Agregado de biomasa acidogénica adaptada a la degradación de almidón, 100x.

La segunda etapa de operación del reactor, descrita en el Capítulo 4, que consideró diferentes razones DQO/N, utilizó como inóculo la biomasa agregada descrita anteriormente. Sin embargo, esta perdió la apariencia granular señalada, formando flóculos de gran tamaño aunque con buena capacidad de sedimentación.

Con el fin de mejorar sus propiedades físicas y tomando en consideración evidencias reportadas en bibliografía (Liu y Tay, 2004), a partir del día 92 de operación se incluyó una fuente de calcio en la alimentación, en la forma de CaCl_2 anhidro (ver Tabla 2.1 y apartado 4.4.1). El efecto positivo se hizo ver rápidamente, incrementando notoriamente su sedimentabilidad al aumentar la densidad de la biomasa y hacerla más compacta. La biomasa desarrollada en estas experiencias tiene un color blanquecino, mucho más claro que la obtenida en la primera etapa de la operación del reactor (Capítulo 3).

La decisión de incluir este catión en la formulación de la alimentación se basa en antecedentes bibliográficos que indican que la presencia de iones divalentes como el Ca^{+2} juega un papel importante en el proceso de formación de agregados estables de biomasa, tanto aerobios (Jiang *et al.*, 2003) como anaerobios (Yu *et al.*, 2001b), ello a pesar de que los mecanismos involucrados en el fenómeno de autoinmovilización bacteriana aún no se han esclarecido totalmente. Los iones de calcio podrían actuar como puente entre los sitios cargados negativamente de los EPS, formar parte de la matriz polimérica de las células o neutralizar las cargas negativas de las células (Morgan *et al.*, 1990). Grotenhuis *et al.* (1991) determinaron que la remoción de calcio por medio de compuestos específicos (EDTA o EGTA) provoca la desintegración o debilitación de la estructura de los gránulos, al liberar los EPS. Por otra parte, los precipitados de sales como carbonato de calcio o fosfato de calcio pueden servir de soportes inertes naturales para las bacterias (Ghangrekar *et al.*, 2005). Si bien es cierto, se ha reportado que la dosificación de calcio en concentraciones de hasta 300 ppm estimula la formación de gránulos (Mahoney *et al.*, 1987; Teo *et al.*, 2000), un exceso en la dosificación de calcio puede afectar negativamente su estructura (Mahoney *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 2001b).

En las Figura 6.5 y 6.6 se muestran las curvas de sedimentación de la biomasa desarrollada en los experimentos descritos en el Capítulo 3 y 4, respectivamente. En ellas se observa la buena sedimentabilidad de la biomasa acidogénica desarrollada en forma de agregados, en ambos casos, al compararla con el lodo metanogénico utilizado como inóculo.

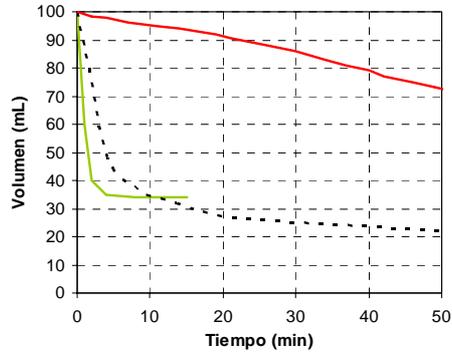


Figura 6.5. Curvas de sedimentación de la biomasa desarrollada en la etapa 1.
 Símbolos: lodo metanogénico (---); lodo flocculento disperso (rojo); lodo agregado (verde).

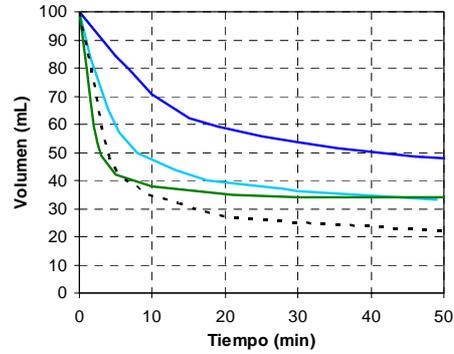


Figura 6.6. Curvas de sedimentación de la biomasa desarrollada en la etapa 2.
 Símbolos: lodo metanogénico (---); lodo flocculento compacto (azul); lodo + calcio (azul claro); lodo agregado + calcio (verde).

La apariencia de la biomasa agregada en presencia de calcio se muestra en la Figura 6.7, comparada con la biomasa flocculenta del periodo de operación previo a la adición del catión. Se incluyen gránulos metanogénicos, con fines comparativos.

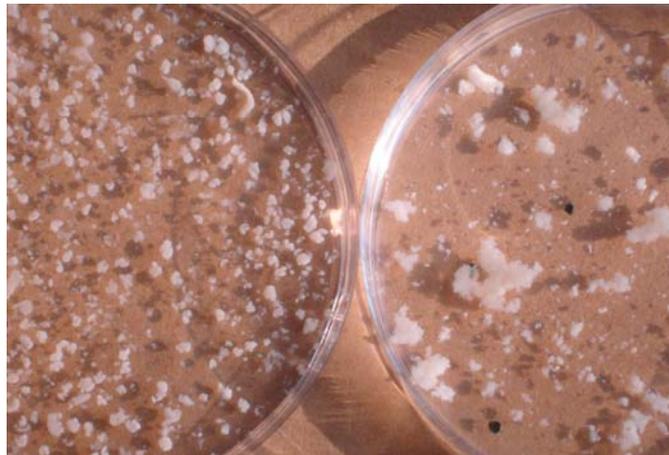


Figura 6.7. Lodo agregado en presencia de calcio (izquierda), biomasa acidogénica de tipo flocculento compacto de la etapa sin adición de calcio (derecha). En la figura de la derecha se incluyen gránulos metanogénicos (de color negro).



Figura 6.8. Biomasa acidogénica floculenta compacta de la etapa previa a la adición de calcio. Los gránulos negros corresponden a biomasa metanogénica.



Figura 6.9. Biomasa acidogénica agregada en presencia de calcio.

Es importante destacar que la biomasa tuvo siempre un porcentaje bajo de cenizas, no mostrando incremento en dicho valor al incorporar calcio en la alimentación, contrariamente a lo esperado, debido a que el calcio pasa a formar parte integral de los agregados bacterianos. En la Tabla 6.1 se resume el porcentaje de ceniza de los lodos analizados, apreciándose que en todos los casos hay un incremento de la fracción orgánica de la biomasa en comparación con la biomasa metanogénica utilizada como inóculo. Estos valores son inferiores a los reportados habitualmente para lodos granulares metanogénicos, los que varían entre un 10 y un 90% (Schmidt y Ahring, 1996), dependiendo de la composición del agua residual, condiciones de operación, etc.

Tabla 6.1. Porcentaje de materia inorgánica en los distintos tipos de biomasa desarrollada.

	Tipo de lodo	Porcentaje de cenizas
Etapa 1	Lodo metanogénico granular	42,2
	Lodo floculento disperso	8,2
	Lodo agregado	4,1
Etapa 2	Lodo floculento compacto	9,2
	Lodo floculento con calcio	0,6
	Lodo agregado con calcio	3,2

A pesar de la gran variabilidad en el tipo de biomasa desarrollada en diversos sistemas de tratamiento anaerobios de aguas residuales, se han establecido algunas correlaciones. En general, los gránulos crecidos en un medio complejo son más grandes y tienen menos ceniza que los crecidos en sustratos simples como acetato, glucosa, etc. De la misma manera, en condiciones termófilas los gránulos desarrollados son más grandes que en un sistema mesófilo bajo las mismas condiciones operacionales (Schmidt y Ahring, 1994). También se ha relacionado la densidad de los agregados directamente con el contenido de cenizas, aunque un elevado contenido de cenizas provoca problemas difusionales al interior del gránulo y una baja porosidad.

Ghangrekar *et al.* (2005) establecieron la variación del contenido de cenizas en función de la VCO aplicada en el periodo de puesta marcha, determinando que las condiciones más favorables de operación y el mejor comportamiento del reactor se obtienen con biomasa con contenidos de cenizas entre 40 y 60% en la fase de puesta en marcha, esto debido a que la biomasa con un contenido de materia orgánica mayor al 60% presentaba problemas de flotación, afectando el Tiempo de Residencia de Sólidos (TRS). Para desarrollar este tipo de lodo fue necesario aplicar VCO entre 2 y 4,5 $\text{kg}_{\text{DQO}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$ o 0,15-0,3 $\text{kg}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{SSV}}\cdot\text{d}$. Una vez que la biomasa granular ha sido desarrollada es posible incrementar la VCO, disminuyendo de esa manera el contenido de cenizas, sin afectar la biomasa desarrollada. La importancia de este parámetro no ha sido discutida particularmente.

La biomasa agregada en presencia de calcio mostró ser muy estable, al conservar sus propiedades físicas al cabo de aproximadamente un año de almacenamiento a 4°C en buffer EPS (ver apartado 6.3.3.a). En la Figura 6.10 se muestra una imagen de la sedimentación de lodos agregados con calcio tras 360 días de almacenamiento.

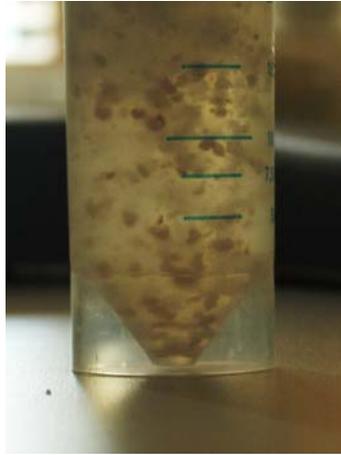


Figura 6.10. Sedimentación de lodos acidogénicos agregados, almacenados durante 1 año a 4°C en buffer EPS.

Los polímeros extracelulares (EPS) pueden ser descritos como componentes de elevado peso molecular (superior a 10 kDa) producidos por los microorganismos bajo ciertas condiciones. Estos polímeros se originan por síntesis y excreción biológica o a partir de productos de actividad lítica, y frecuentemente han sido encontrados en la superficie de agregados bacterianos (Morgan *et al.*, 1990). Tenney y Verhoff (1973) proponen que los polímeros expuestos en la superficie microbiana pueden actuar absorbiendo y formando puentes entre las superficies celulares y por lo tanto iniciar el proceso de floculación. Hoy en día, está claro el importante papel que juegan los EPS en la formación y estabilidad de flóculos, biofilms y gránulos (Veiga *et al.*, 1997; Flemming y Wingender, 2001; Liao *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004b).

Los EPS están formados principalmente por polisacáridos y proteínas y en menor medida por ácidos nucleicos, lípidos, sustancias húmicas y heteropolímeros como por ejemplo glicoproteínas (Goodwin y Forster, 1985; Frölund *et al.*, 1996; Flemming y Wingender, 2001). La relación entre dichos componentes presenta grandes variaciones dependiendo de la técnica de extracción de EPS utilizada y del tipo de lodo analizado. Sin embargo, diversas investigaciones han establecido que la composición de los EPS, especialmente la razón proteína/carbohidrato, es un factor preponderante en el fenómeno de agregación bacteriana (Shin *et al.*,

2001; Liao *et al.*, 2001; Tay *et al.*, 2001b; Punal *et al.*, 2003), aunque no el contenido total de EPS, el cual si podría estar relacionado con la sedimentabilidad de la biomasa en el caso de lodos activos (Liao *et al.*, 2001). Una extensa revisión de efecto de los EPS sobre la formación y estabilidad de gránulos microbianos ha sido presentada por Liu *et al* (2004b).

En la Figura 6.11 se presenta la caracterización de los EPS extraídos de la biomasa descrita en los párrafos anteriores, con diversos estados de agregación y el valor del parámetro IVL, relacionado con la sedimentabilidad del lodo. Se muestra la relación proteína/azúcares totales (P/AT) y el contenido de ambos componentes en relación a la biomasa (P/SSV y AT/SSV).

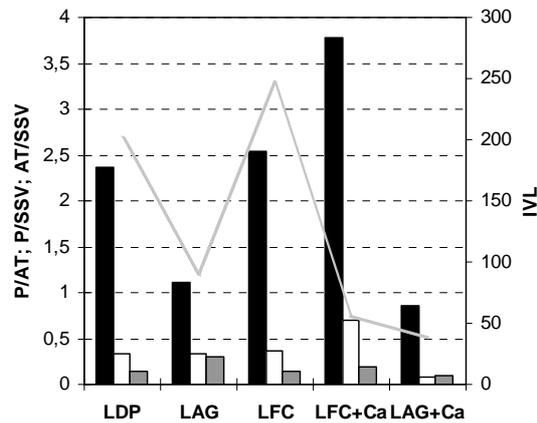


Figura 6.11. Caracterización de EPS (P/AT: negro; P/SSV: blanco; AT/SSV: gris) y valor de IVL (—) de la biomasa acidogénica adaptada a la degradación de almidón en diversos estados de agregación. Símbolos: lodo disperso (LDP); lodo agregado (LAG); lodo floculento compacto (LFC); lodo floculento con calcio (LFC+Ca); lodo agregado con calcio (LAG+Ca). P: proteína, AT: azúcares totales, SSV: biomasa.

Como se observa, la relación P/AT es claramente distinta en los casos de biomasa agregada (LAG y LAG+Ca) en comparación con el resto de la biomasa analizada, alcanzando un valor cercano a 1. Esto indica una cantidad similar de ambos componentes en la mezcla de EPS, a diferencia de los otros casos en los que el contenido proteico es mucho mayor que la cantidad de carbohidratos. Por otra parte, considerando los contenidos individuales (P/SSV y AT/SSV) se observa

que en el caso de LAG+Ca la cantidad de ambos componentes es sustancialmente menor que en el resto de la biomasa analizada, obteniéndose incluso en este caso una menor cantidad de proteína que de azúcares totales.

Como ya se mencionó, diversos autores han establecido la importancia del parámetro P/AT en el proceso de agregación bacteriana y en la estabilidad de los agregados formados, tanto en el caso de biomasa aerobia como anaerobia. De esta manera, Batstone y Keller (2001) y Martínez *et al.* (2004) señalan que lodos con una relación P/AT elevada mostraron una mala resistencia estructural y baja sedimentabilidad, lo que es coherente con los resultados obtenidos en esta investigación. Por otro lado, se ha visto que las características físicas de los gránulos de biomasa aerobia mejoran con la disminución de la razón P/AT (Tay *et al.*, 2001a; Tay *et al.*, 2002). Analizando los resultados del lodo disperso (LDP) y del lodo agregado (LAG), que corresponden a la biomasa del mismo experimento en distintos tiempos de operación, pareciera que la agregación de lodo tendría que ver con el incremento del contenido de azúcares totales ya que la proteína permanece aproximadamente constante. Del mismo modo, el lodo floculento (LFC) correspondiente al lodo LAG utilizado como inóculo para la segunda etapa de operación, se habría desestabilizado al disminuir el contenido de azúcares totales a valores semejantes a los de la biomasa LDP, permaneciendo inalterado el contenido de proteína. La muestra de lodo floculento al que se añadió calcio (LFC+Ca) permanecería en la forma no agregada debido al importante aumento de los polímeros proteicos. Sin embargo, el resultado obtenido para la biomasa agregada en presencia de calcio no responde a dichos patrones. Jiang *et al.* (2003) concluyeron que el incremento del contenido de polisacáridos en los EPS producidos se correlaciona con la alta resistencia y densidad de los gránulos aerobios formados en presencia de calcio, coincidiendo con los resultados presentados por otros autores.

Durante la operación con almidón se ensayaron diferentes razones DQO/N, trabajando en algunas de ellas bajo limitación de nitrógeno, lo que también pudo haber constituido un factor que indujera el fenómeno de agregación bacteriana, favorecido por la adición de calcio. De acuerdo con lo anterior, Puñal *et al.* (2003)

establecen que bajo condiciones de limitación por nitrógeno se favorece la producción de EPS, lo cual aceleraría el proceso de granulación.

El valor de IVL permite determinar la compresibilidad del lodo y está relacionada con su sedimentabilidad. A pesar de que la reproducibilidad de este parámetro es discutida pues el resultado está fuertemente influenciado por el equipo de sedimentación, temperatura, concentración y volumen de biomasa y forma del flóculo (Dick y Vesilind, 1969; Daigger y Roper, 1985), empíricamente se ha establecido una clasificación del tipo de biomasa y su capacidad de sedimentación según el valor de IVL (ver Tabla 6.2), lo cual se ha convertido en una herramienta muy útil debido a la sencillez del procedimiento.

Tabla 6.2. Clasificación de la capacidad de sedimentación de la biomasa de acuerdo al valor de IVL.

Sedimentabilidad	IVL (mL/g)
Muy buena	0-50
Buena	50-100
Regular	100-200
Mala	200-300
Muy mala	300-400

Según lo indicado en la Figura 6.11, los valores menores de IVL obtenidos corresponden a los periodos con adición de calcio, incluso para el caso en que la biomasa no se encuentra agregada (LFC+Ca). Para la primera etapa de operación (sin adición de calcio), la biomasa agregada también presenta un valor de IVL menor al de la biomasa floculenta (LFC) o dispersa (LDP), pero mayor que los valores obtenidos en la fase con calcio. De esta manera, los resultados obtenidos indicarían que los EPS no tendrían relación directa con la sedimentabilidad de los lodos. Una observación similar fue realizada por Shin *et al.* (2001) al analizar la biomasa de reactores SBR.

La sedimentabilidad de la biomasa agregada, de acuerdo al valor de IVL, se puede clasificar como buena a muy buena, mientras que para los casos de mayor IVL, la biomasa presenta una sedimentabilidad de regular a mala, lo cual coincide con los perfiles de sedimentación presentados en la Figura 6.5 y Figura 6.6. El valor de

IVL se ha correlacionado con una serie de parámetros (distribución de tamaño de los flóculos, carga superficial, sedimentabilidad, hidrofobicidad, EPS) en estudios realizados con lodos activos (Jin *et al.*, 2003), parámetros que también son analizados para los agregados anaerobios.

Los agregados formados en presencia de calcio, además de mejorar sus características físicas de resistencia, sedimentación y estabilidad, presentan una mayor actividad hidrolítica y acidogénica, en relación a los valores obtenidos para la biomasa agregada al fin de la operación del reactor, descrita en el Capítulo 3. En la Tabla 6.3 se resumen los valores obtenidos de actividad hidrolítica y acidogénica, a 15°C, para el inóculo metanogénico, biomasa agregada de la etapa 1 (Capítulo 3) y de la etapa 2, con calcio (Capítulo 4).

Tabla 6.3. Actividad hidrolítica y acidogénica de biomasa metanogénica y acidogénica a 15°C.

	Actividad hidrolítica	Actividad acidogénica
	galmidón degradado/gSSV·d	gglucosa degradada/gSSV·d
Inóculo metanogénico	0,23	0,21
Biomasa agregada sin calcio	3,48	0,67
Biomasa agregada con calcio	12,8	0,88

6.4.2 Operación con gelatina

La operación del reactor utilizando gelatina como fuente de carbono y nitrógeno fue presentada en el Capítulo 5, considerando la operación de un reactor de lecho ascendente con distintos TRH.

El inóculo utilizado corresponde a la biomasa acidogénica desarrollada durante la operación del reactor utilizando almidón como sustrato, con las características descritas en el apartado 5.3.2.b.

La biomasa, originalmente de color blanquecino y con una buena sedimentabilidad, se tornó rápidamente de color negro perdiendo su forma granular y presentando una fuerte tendencia a la flotación, a pesar de haberse mantenido el calcio en la formulación de la alimentación. Hacia el final de la operación, la biomasa aunque en su mayoría mantuvo el aspecto floculento, se

hizo más compacta, detectándose la presencia de algunas aglomeraciones de bordes definidos que podrían corresponder a agregados inmaduros. El color negro se debería a la presencia de sulfuro de hierro proveniente de la degradación de aminoácidos sulfurados.

La apariencia del lodo acidogénico con capacidad proteolítica se muestra en la Figura 6.12, donde además se presenta, a manera de comparación, biomasa acidogénica en proceso de granulización adaptada a la degradación de carbohidratos y biomasa metanogénica.

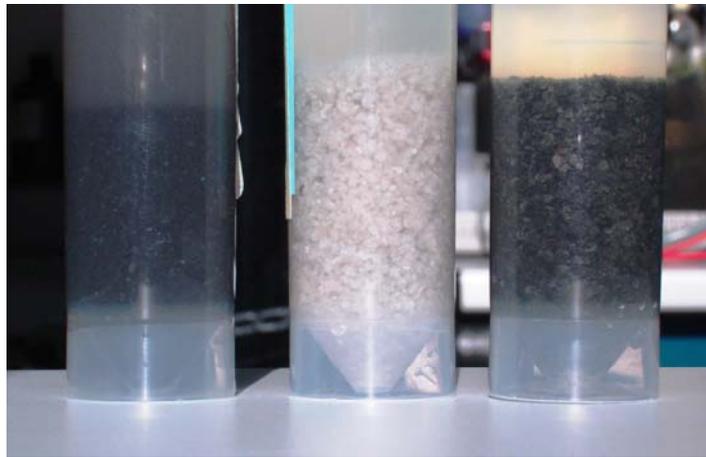


Figura 6.12. Biomasa acidogénica con capacidad proteolítica (izquierda), biomasa acidogénica parcialmente agregada adaptada a la degradación de carbohidratos (centro), biomasa metanogénica granular (derecha).

En la Figura 6.13 se muestra una fotografía de una mezcla de lodos adaptados a la degradación de almidón y lodos proteolíticos. Según se observa, los lodos con capacidad proteolítica son de color negro y de aspecto disgregado, mientras que de tamaño más pequeño se ven los lodos degradadores de carbohidratos de color blanco en su forma floculenta compacta.

Finalmente, en la Figura 6.14 se muestra una vista de general de la biomasa proteolítica, en donde se aprecian flóculos de diversos tamaños, algunos de ellos más compactos y de aspecto uniforme.

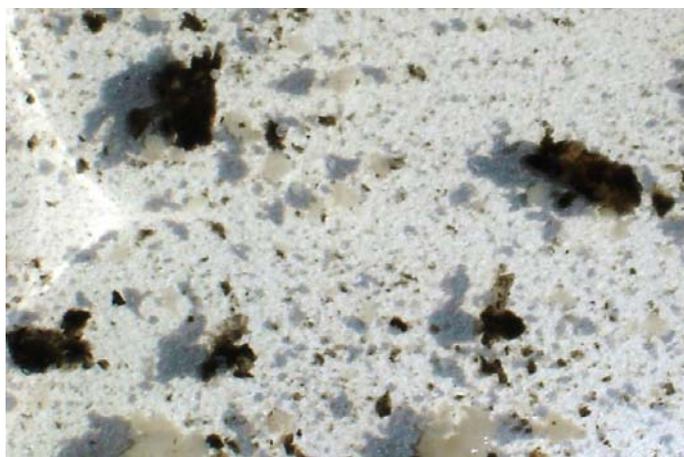


Figura 6.13. Mezcla de lodos anaerobios acidogénicos adaptados a la degradación de carbohidratos (de color blanco) y adaptado a la degradación de proteínas (de color negro).

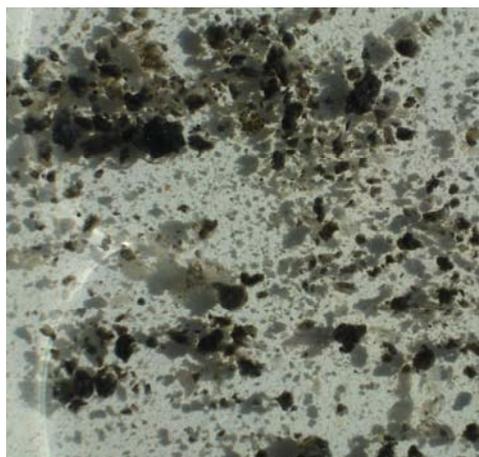


Figura 6.14. Fotografía de biomasa acidogénica adaptada a la degradación de gelatina.

En la Figura 6.15 se muestra la curva de sedimentación de la biomasa proteolítica, en donde se ha incluido también, con fines comparativos, las curvas de la biomasa adaptada a la degradación de almidón descrita en el apartado 6.4.1. Como se observa, los lodos con capacidad proteolítica tienen una sedimentabilidad típica de una biomasa floculenta, la que en su fase inicial se asemeja a la curva del lodo disperso (en rojo en el gráfico) que presentó una sedimentabilidad baja. Sin

embargo, al cabo de aproximadamente 20 minutos se produce la coalescencia de los flóculos, decantando rápidamente.

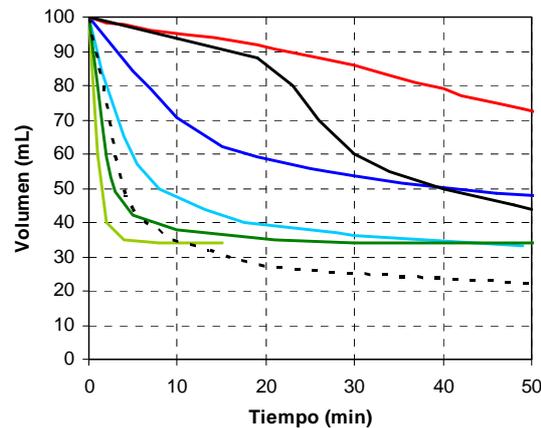


Figura 6.15. Curva de sedimentación de lodos acidogénicos adaptados a la degradación de gelatina (negro), biomasa adaptada a la degradación de almidón (rojo: lodo flocculento disperso; azul oscuro y claro: lodo flocculento compacto sin y con calcio, respectivamente; verde oscuro y claro: biomasa agregada sin y con calcio, respectivamente) y lodo metanogénico granular (----).

El porcentaje de cenizas de este lodo fue bastante variable ($2,8 \pm 3,5$) pero comparable al descrito en la Tabla 6.1 para la biomasa desarrollada en un agua rica en carbohidratos.

En la Figura 6.16 se presenta la caracterización de los EPS extraídos de la biomasa proteolítica, con diversos estados de agregación y el valor del parámetro IVL, relacionado con la sedimentabilidad del lodo, incluyendo con fines comparativos los valores correspondientes a la biomasa adaptada a la degradación de almidón. Se muestra la relación proteína/azúcares totales (P/AT) y el contenido de ambos componentes en relación a la biomasa (P/SSV y AT/SSV).

En concordancia con los valores de P/AT obtenidos para el lodo adaptado a la degradación de almidón en estado no agregado (LDP, LFC, LFC+Ca), en el caso del lodo proteolítico (LP) esta razón es muy alta, indicando un alto contenido proteico de los EPS, y por ende acorde a su forma flocculenta. Por otro lado, se

aprecia que el contenido de proteína y de carbohidratos totales por unidad de biomasa (P/SSV y AT/SSV) es muy bajo, de manera que se infiere que el valor de EPS totales también debería ser menor.

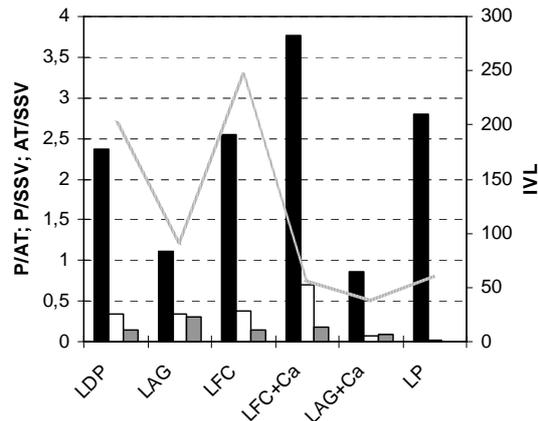


Figura 6.16. Caracterización de EPS (P/AT: negro; P/SSV: blanco; AT/SSV: gris) y valor de IVL (—) de la biomasa acidogénica adaptada a la degradación de almidón y de gelatina, en diversos estados de agregación. Símbolos: lodo disperso (LDP); lodo agregado (LAG); lodo floculento compacto (LFC); lodo floculento con calcio (LFC+Ca); lodo agregado con calcio (LAG+Ca); lodo proteico (LP). P: proteína, AT: azúcares totales, SSV: biomasa.

Batstone y Keller (2001) reportaron que la composición de los EPS está directamente relacionada con la composición del agua residual tratada, de manera que se obtienen EPS ricos en proteínas operando con aguas residuales proteicas y EPS ricos en carbohidratos para aguas residuales con otro tipo de sustratos orgánicos. Otros autores también han indicado la relación entre la cantidad y composición de los EPS y el tipo de agua residual tratada aunque en dichos estudios no se incluyen las aguas proteicas (Shen *et al.*, 1993; Schmidt y Ahring, 1994).

Aunque las observaciones de Batstone y Keller no se ajustan completamente a los resultados obtenidos en esta investigación, es claro que el cambio de sustrato ocasionó diferencias en la cantidad de EPS extraído, aunque la adición de calcio podría afectar la extracción de los polímeros, dado que se notó una disminución

en la cantidad de proteína y carbohidratos extraídos en el caso de la biomasa LAG+Ca.

Al igual que para el caso del lodo adaptado a la degradación de carbohidratos, la presencia de calcio en la alimentación mejora la sedimentabilidad del lodo, alcanzando valores de IVL similares, a pesar de su aspecto básicamente floculento. Sin embargo, el análisis fotográfico sugiere la formación de pequeños flóculos de apariencia más compacta y bordes uniformes que podría indicar el inicio del proceso de agregación.

6.5 Conclusiones

En este capítulo se describen las características de la biomasa desarrollada en los procesos de degradación anaerobia en condiciones psicrófilas de almidón y gelatina, llevados a cabo por biomasa hidrolítica-acidogénica. Los resultados indicaron que en el primer caso, los microorganismos son capaces de formar agregados estables en presencia de calcio, al operar en un reactor de lecho ascendente y en condiciones de deficiencia de nitrógeno, alcanzando un valor de IVL del orden de 50, indicativo de una buena capacidad de sedimentación. En el caso de la operación con gelatina, si bien es cierto que los resultados no son tan concluyentes, la presencia de formaciones de aspecto uniforme permite sugerir el inicio del proceso de agregación bacteriana.

El seguimiento de la razón proteína/azúcares totales (P/AT) en los EPS extraídos constituye un parámetro adecuado para caracterizar el estado de agregación de la biomasa. Así, la razón P/AT en el caso de la biomasa no agregada puede llegar a ser hasta cuatro veces mayor que para la biomasa granular, en donde la relación se aproxima a la unidad. Por otro lado, el incremento del contenido de azúcares totales podría estar relacionado con el suceso de agregación bacteriana, mientras que el aumento del contenido proteico impediría el desarrollo de dicho fenómeno.

6.6 Referencias

Alves, M., Cavaleiro, A.J., Ferreira, E.C., Amaral, A.L., Mota, M., da Motta, M., Vivier, H. and Pons, M.N. (2000) Characterisation by image analysis of anaerobic sludge under shock conditions. *Water Science and Technology*, **41** (12), 207-214.

- Angenent,L.T. and Sung,S. (2001) Development of anaerobic migrating blanket reactor (AMBR), a novel anaerobic treatment system. *Water Research*, **35** (7), 1739-1747.
- APHA-AWWA-WPCF (1998) *Standard methods for examination of water and wastewater*. 20th Ed. Washington.
- Azeredo,J., Henriques,M., Sillankorva,S. and Oliveira,R. (2003) Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Science and Technology*, **47** (5), 175-179.
- Batstone,D.J. and Keller,J. (2001) Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type. *Water Research*, **35** (7), 1723-1729.
- Brown,M.J. and Lester,J.N. (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **40** (2), 179-185.
- Chen,J. and Lun,S.Y. (1993) Study on mechanism of anaerobic sludge granulation in UASB reactors. *Water Science and Technology*, **28** (7), 171-178.
- Daigger,G.T. and Roper,R.E. (1985) The relationship between SVI and activated sludge settling characteristics. *Journal Water Pollution Control Federation*, **57** (8), 859-866.
- Dick,R.I. and Vesilind,P.A. (1969) Sludge Volume Index - What Is It. *Journal Water Pollution Control Federation*, **41** (7), 1285-&.
- Dolfing,J. (1986) Granulation in UASB Reactors. *Water Science and Technology*, **18** (12), 15-25.
- El-Mamouni,R., Leduc,R. and Guiot,S.R. (1997) Influence of the starting microbial nucleus type on the anaerobic granulation dynamics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **47** (2), 189-194.
- El-Mamouni,R., Leduc,R. and Guiot,S.R. (1998) Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Science and Technology*, **38** (8-9), 341-347.
- Fang,H.H., Liu,H. and Zhang,T. (2002) Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, **78** (1), 44-52.
- Fang,H.H.P., Chui,H.K. and Li,Y.Y. (1994) Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters. *Water Science and Technology*, **30** (12), 87-96.
- Flemming,H.C. and Wingender,J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, **43** (6), 1-8.
- Forster,C.F. and Clarke,A.R. (1983) The production of polymer from activated sludge by ethanolic extraction and its relation to treatment-plant operation. *Journal Water Pollution Control Federation*, **82** (3), 430-433.
- Frankin,R.J. (2001) Full-scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewater. *Water Science and Technology*, **44** (8), 1-6.

- Frölund, B., Palmgren, R., Keiding, K. and Nielsen, P.H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, **30** (8), 1749-1758.
- Fukuzaki, S., Nishio, N. and Nagai, S. (1995) High-rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in upflow anaerobic sludge blanket reactors fed with various defined substrates. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **79** (4), 354-359.
- Ghangrekar, M.M., Asolekar, S.R. and Joshi, S.G. (2005) Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. *Water Research*, **39** (6), 1123-1133.
- Gonzalez-Gil, G., Lens, P.N.L., Van Aelst, A., Van As, H., Versprille, A.I. and Lettinga, G. (2001) Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (8), 3683-3692.
- Goodwin, J.A.S. and Forster, C.F. (1985) A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Water Research*, **19** (4), 527-533.
- Grotenhuis, J.T.C., Vanlier, J.B., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. (1991) Effect of ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N-tetraacetic acid (EGTA) on stability and activity of methanogenic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36** (1), 109-114.
- Jeong, H.S., Kim, Y.H., Yeom, S.H., Song, B.K. and Lee, S.I. (2005) Facilitated UASB granule formation using organic-inorganic hybrid polymers. *Process Biochemistry*, **40** (1), 89-94.
- Jiang, H.L., Tay, J.H., Liu, Y. and Tay, S.T. (2003) Ca⁺² augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. *Biotechnology Letters*, **25** (2), 95-99.
- Jin, B., Wilen, B.M. and Lant, P. (2003) A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, **95** (1-3), 221-234.
- Kalogo, Y., Seka, A.M. and Verstraete, W. (2001) Enhancing the start-up of a UASB reactor treating domestic wastewater by adding a water extract of *Moringa oleifera* seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55** (5), 644-651.
- Liao, B.Q., Allen, D.G., Droppo, I.G., Leppard, G.G. and Liss, S.N. (2001) Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research*, **35** (2), 339-350.
- Liu, H. and Fang, H.H.P. (2003) Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge. *Water Science and Technology*, **47** (1), 153-158.
- Liu, Y. and Tay, J.H. (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, **22** (7), 533-563.

- Liu, Y., Xu, H.L., Show, K.Y. and Tay, J.H. (2002) Anaerobic granulation technology for wastewater treatment. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18** (2), 99-113.
- Liu, Y., Yang, S.F., Tay, J.H., Liu, Q.S., Qin, L. and Li, Y. (2004a) Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. *Enzyme and Microbial Technology*, **34** (5), 371-379.
- Liu, Y.Q., Liu, Y. and Tay, J.H. (2004b) The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65** (2), 143-148.
- Lovett, D.A., Kavanagh, B.V. and Herbert, L.S. (1983) Effect of sludge age and substrate composition on the settling and dewatering characteristics of activated sludge. *Water Research*, **17** (11), 1511-1515.
- Mahoney, E.M., Varangu, L.K., Cairns, W.L., Kosaric, N. and Murray, R.G.E. (1987) The Effect of Calcium on Microbial Aggregation During Uasb Reactor Start-Up. *Water Science and Technology*, **19** (1-2), 249-260.
- Martinez, F., Lema, J., Mendez, R., Cuervo-Lopez, F. and Gomez, J. (2004) Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Bioresource Technology*, **94** (1), 43-48.
- McLeod, 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.
- Morgan, J.W., Forster, C.F. and Evison, L. (1990) A comparative-study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Water Research*, **24** (6), 743-750.
- O'Flaherty, V., Lens, P.N.L., deBeer, D. and Colleran, E. (1997) Effect of feed composition and upflow velocity on aggregate characteristics in anaerobic upflow reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **47** (2), 102-107.
- 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.
- Pol, L.W.H., Lopes, S.I.D., Lettinga, G. and Lens, P.N.L. (2004) Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, **38** (6), 1376-1389.
- Punal, A., Brauchi, S., Reyes, J.G. and Chamy, R. (2003) Dynamics of extracellular polymeric substances in UASB and EGSB reactors treating medium and low concentrated wastewaters. *Water Science and Technology*, **48** (6), 41-49.
- Sato, T. and Ose, Y. (1985) Floc-forming substances extracted from activated-sludge with ammonium hydroxide and EDTA solutions. *Water Science and Technology*, **17** (4-5), 517-528.
- 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.

- Schmidt, J.E. and Ahring, B.K. (1996) Granular sludge formation in upflow anaerobic sledge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **49** (3), 229-246.
- Shen, C.F., Kosaric, N. and Blaszczyk, R. (1993) The effect of selected heavy-metals (Ni, Co and Fe) on anaerobic granules and their extracellular polymeric substance (EPS). *Water Research*, **27** (1), 25-33.
- Shin, H.S., Kang, S.T. and Nam, S.Y. (2001) Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Water Science and Technology*, **43** (6), 193-196.
- Skiadas, I.V., Gavala, H.N., Schmidt, J.E. and Ahring, B.K. (2003) Anaerobic granular sludge and biofilm reactors. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, **82**, 35-67.
- Sutherland, I.W. (2001) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology*, **43** (6), 77-86.
- Tarre, S., Armon, R., Shelef, G. and Green, M. (1994) Effects of water characteristics on granular sludge formation in a USB reactor for denitrification of drinking-water. *Water Science and Technology*, **30** (9), 141-147.
- Tay, J.H., Liu, Q.S. and Liu, Y. (2001a) The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57** (1-2), 227-233.
- Tay, J.H., Liu, Q.S. and Liu, Y. (2001b) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*, **33** (3), 222-226.
- Tay, J.H., Xu, H.L. and Teo, K.C. (2000) Molecular mechanism of granulation. I: H⁺ translocation-dehydration theory. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, **126** (5), 403-410.
- Tay, J.H., Yang, S.F. and Liu, Y. (2002) Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59** (2-3), 332-337.
- Tenney, M.W. and Verhoff, F.H. (1973) Chemical and autoflocculation of microorganisms in biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, **15** (6), 1045-1073.
- Teo, K.C., Xu, H.L. and Tay, J.H. (2000) Molecular mechanism of granulation. II: Proton translocating activity. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, **126** (5), 411-418.
- Uyanik, S., Sallis, P.J. and Anderson, G.K. (2002) The effect of polymer addition on granulation in an anaerobic baffled reactor (ABR). Part II: compartmentalization of bacterial populations. *Water Res.*, **36** (4), 944-955.
- Vanderhaegen, B., Ysebaert, E., Favere, K., Vanwambeke, M., Peeters, T., Panic, V., Vandenlangenbergh, V. and Verstraete, W. (1992) Acidogenesis in relation to in-reactor granule yield. *Water Science and Technology*, **25** (7), 21-30.

- Veiga, M.C., Jain, M.K., Wu, W.M., Hollingsworth, R.I. and Zeikus, J.G. (1997) Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (2), 403-407.
- Vieira, A.M.S., Bergamasco, R., Gimenes, M.L., Nakamura, C.V. and Dias, B.P. (2001) Microbial populations of an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating wastewater from a gelatin industry. *Environmental Technology*, **22** (12), 1477-1485.
- Wallen, L.L. and Davis, E.N. (1972) Biopolymers of activated sludge. *Environmental Science and Technology*, **6** (2), 161-&.
- Wirtz, R.A. and Dague, R.R. (1997) Laboratory studies on enhancement of granulation in the anaerobic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, **36** (4), 279-286.
- Yu, H.Q., Fang, H.H. and Tay, J.H. (2001a) Enhanced sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by aluminum chloride. *Chemosphere*, **44** (1), 31-36.
- Yu, H.Q., Tay, J.H. and Fang, H.H. (2001b) The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Research*, **35** (4), 1052-1060.

CAPÍTULO SÉPTIMO

Conclusiones

El presente trabajo se centró en el estudio del proceso de hidrólisis y acidogénesis psicrófila de macromoléculas en sistemas anaerobios, considerando dos compuestos modelo: almidón soluble y gelatina, ambos de peso molecular elevado. Las principales conclusiones emanadas a partir de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados, se detallan a continuación:

1. La actividad hidrolítica y acidogénica de la biomasa mesófila metanogénica se ve fuertemente afectada cuando se cultiva en condiciones psicrófilas, disminuyendo su valor 9 y 17 veces, respectivamente. Esta biomasa operada en condiciones no metanogénicas (bajos TRH) pierde su capacidad metanogénica y se adapta a la operación a baja temperatura (15°C), aumentando 15 veces su actividad hidrolítica y 3 veces la actividad acidogénica, en relación al inóculo. La biomasa desarrollada en presencia de calcio alcanza una elevada capacidad hidrolítica, 56 veces mayor a la del inóculo metanogénico, aunque su actividad acidogénica mejora levemente.
2. Los mejores resultados del proceso de hidrólisis/acidogénesis de almidón de 160 kDa de peso molecular, se obtienen cuando se utiliza un reactor de lecho ascendente, en comparación con un RCTA con reciclaje de biomasa, debido a la formación de biomasa compacta de buena sedimentabilidad; de manera que es posible operar el sistema con una eficacia superior al 93% de hidrólisis y 67% de acidificación, trabajando con un TRH de 3 horas y una VCO de hasta 24 $\text{kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$. En estas condiciones de operación el efluente contiene un 60% de moléculas de tamaño inferior a 1 kDa, siendo la fracción superior a 100 kDa completamente degradada a moléculas de menor tamaño.
3. La eficiencia y estabilidad del proceso de hidrólisis de almidón depende del contenido de nitrógeno alimentado al sistema más que de la relación DQO/N de la alimentación, existiendo una concentración límite del nutriente para satisfacer los requerimientos de los microorganismos para llevar a cabo adecuadamente sus procesos metabólicos. Así, para una VCO de 12 y 24

$\text{kg}_{\text{almidón}}/\text{m}^3_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$ y TRH de 3 horas, la fracción soluble (tamaño menor que 1 kDa) obtenida es del 40% en condiciones de carencia de nitrógeno, aumentando hasta un 70% y 60%, respectivamente, cuando el nutriente está en una concentración adecuada (12 mg/L). La etapa de acidificación no parece estar afectada de la misma forma.

4. La eficacia de degradación de gelatina (20 a 25 kDa de peso molecular) llevada a cabo en un reactor de lecho ascendente depende del TRH de operación. De esta manera, cuando se opera con un TRH de 12 horas, la fracción de tamaño superior a 10 kDa no es hidrolizada por la biomasa y la fracción de 1-10 kDa es completamente metabolizada, obteniéndose un efluente con un 60% de moléculas solubles. El incremento del TRH hasta 36 horas aumenta la fracción soluble al 94%, manteniendo cerca de un 5 % en la forma de mayor tamaño.
5. El acoplamiento de un sistema de ultrafiltración tangencial (UF) tanto para el caso del proceso de degradación de almidón como para la gelatina, permite obtener un efluente altamente soluble, rico en moléculas de bajo peso molecular, principalmente una mezcla de acetato, propionato y butirato. En el caso de la gelatina, ensayos realizados con la técnica de OUR determinaron que la fracción biodegradable de la corriente de alimentación aumenta del 26% al 42% cuando se utiliza la digestión anaerobia como sistema de pretratamiento a un proceso convencional de lodos activos y hasta un 52% si se acopla el equipo de UF.
6. La biomasa desarrollada en los procesos de degradación de almidón y gelatina a baja temperatura, es capaz de formar agregados de características de sedimentabilidad similares a los gránulos metanogénicos, aunque en el caso de la gelatina sólo se obtienen pequeños aglomerados inestables. La operación alternada con deficiencia y suficiencia de nitrógeno favorece la formación de agregados que densifican notablemente en presencia de calcio, mejorando sustancialmente su sedimentabilidad. La razón proteína/azúcares totales de los EPS representa adecuadamente el estado de agregación de la biomasa, presentando valores elevados para la biomasa no agregada (3-4) y valores cercanos a 1 en el caso de producirse el fenómeno de agregación.

Conclusións

O presente traballo centrouse no estudio do proceso de hidrólise e acidoxénese psicrófila de macromoléculas en sistemas anaerobios, considerando dúas moléculas modelo: amidón soluble e xelatina, ámbalas de peso molecular elevado. As principais conclusións emanadas a partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados, detállanse a continuación:

1. A actividade hidrolítica e acidoxénica da biomasa mesófila metanoxénica vese fortemente afectada cando se cultiva en condicións psicrófilas diminuíndo o seu valor 9 e 17 veces, respectivamente. Esta biomasa opera en condicións no metanoxénicas (baixo TRH) perde a súa capacidade metanoxénica e adáptase á operación a baixa temperatura (15°C) aumentando 15 veces a súa actividade hidrolítica e 3 veces a súa actividade acidoxénica, en relación ó inóculo. A biomasa desenrolada en presenza de calcio alcanza unha elevada capacidade hidrolítica, 56 veces maior á do inóculo metanoxénico, mentres que a súa actividade acidoxénica mellora levemente tamén en relación a dita poboación.
2. No proceso de hidrólise/acidoxénese de amidón de 160 kDa de peso molecular, obtéñense os mellores resultados cando se utiliza un reactor de leito ascendente, en comparación cun reactor RCTA con reciclo de biomasa, debido á formación de biomasa compacta de boa sedimentabilidade; de maneira que é posible operar o sistema cunha eficacia superior á 93% de hidrólise e 67% de acidificación, traballando cun TRH de 3 horas e unha VCO de ata 24 $\text{kg}_{\text{amidón}}/\text{m}^3_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$. Nestas condicións de operación o efluente contén un 60% de moléculas de tamaño inferior a 1 kDa, sendo a fracción superior a 100 kDa (de maior tamaño) completamente degradada a moléculas de menor tamaño.
3. A eficiencia e estabilidade do proceso de hidrólise de amidón depende do contido en nitróxeno alimentado ó sistema máis que da relación DQO/N da alimentación, existindo unha concentración límite do nutriente para satisfacer os requirimentos dos microorganismos para levar a cabo adecuadamente os seus procesos metabólicos. Así, para unha VCO de 12 e 24 $\text{kg}_{\text{amidón}}/\text{m}^3_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$ e TRH de 3 horas, a fracción soluble (tamaño menor que 1 kDa) obtida é do

40% en condicións de carencia de nitróxeno, aumentando ata un 70% e 60%, respectivamente, cando o nutriente está nunha concentración axeitada (12 mg/L). A etapa de acidificación non parece estar afectada da mesma forma.

4. A eficacia de degradación de xelatina (20 a 25 kDa de masa molecular) levada a cabo nun reactor de leito ascendente depende do TRH de operación. De esta maneira, cando se opera cun TRH de 12 horas, a fracción de tamaño superior a 10 kDa non é hidrolizada pola biomasa e a fracción de 1-10 kDa é completamente metabolizada, obténdose un efluente cun 60% de moléculas solubles. O incremento do TRH ata 36 horas aumenta a fracción soluble ó 94%, mantendo preto dun 5% na forma de maior tamaño.
5. Acoplamento dun sistema de ultrafiltración tanxencial (UF) tanto para o caso do proceso de degradación de amidón como para a xelatina, permite obter un efluente altamente soluble, rico en moléculas de baixo peso molecular, principalmente unha mestura de acetato, propionato y butirato. No caso da xelatina, ensaios realizados coa técnica de OUR determinaron que a fracción biodegradable da corrente de alimentación aumenta del 26% ó 41% cando se utiliza a dixestión anaerobia como sistema de pretratamento a un proceso convencional de lamas activas, e ata un 53% se se acopla o equipo de UF.
6. A biomasa desenrolada nos procesos de degradación de amidón e xelatina a baixa temperatura, é capaz de formar agregados de características de sedimentabilidade similares ós gránulos metanoxénicos, aunque no caso da xelatina solo se obteñen pequenos aglomerados inestables. A operación alternada con deficiencia e suficiencia de nitróxeno favorece a formación de agregados que densifican notablemente en presenza de calcio, mellorando substancialmente a súa sedimentabilidade. A razón proteína/azucres totais dos EPS representa adecuadamente o estado de agregación da biomasa, presentando valores elevados para a biomasa non agregada (3-4) e valores próximos a 1 no caso de producirse o fenómeno de agregación.

Conclusions

This project centered on the analysis of the hydrolysis and acidogenic process for macromolecules considering two model molecules: soluble starch and gelatin, both with high molecular weight. The most important conclusions from this study are summarized as follows:

1. The hydrolytic and acidogenic activity of the mesophilic biomass was strongly influenced when cultivated under psychrophilic conditions, showing 9 and 17 fold reductions, respectively. However, under non-methanogenic conditions (low HRT) this biomass lost its methanogenic activity, and when adapted to moderate low temperature operations (15°C), increased its hydrolytic and acidogenic activity with respect to the inoculum value by 15 and 3 fold, respectively. Subsequently, the biomass generated in the presence of calcium achieved an elevated hydrolytic activity, 56 fold larger than the methanogenic inoculum, while its acidogenic value increased only slightly with respect to the inoculum value.
2. In the hydrolysis/acidogenic process for a 160 kDa starch, one can obtain the best results when using an ascending fluidized bed reactor when compared to a CSTR reactor with recycling due to the formation of a compact biomass with good sedimentation ability; therefore, it is possible to operate the system with an hydrolysis efficacy no less than 93% and a 67% acidification, working with an hydraulic residence time (HRT) of 3 h and an organic loading rate (OLR) of $24 \text{ kg}_{\text{starch}}/\text{m}^3_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$. Under these operating conditions, the effluent contained 60% of molecules smaller than 1 kDa and the fraction larger than 100 kDa (larger size) was completely degraded to smaller molecules.
3. The efficiency and stability of the starch hydrolysis process depended more on the nitrogen content fed to the system than the COD/N feed ratio and had a lower nutrient concentration limit satisfying the requirements of the microorganisms to complete adequately their metabolic processes. Therefore for an OLR of 12 and $24 \text{ kg}_{\text{starch}}/\text{m}^3_{\text{reactor}}\cdot\text{d}$ and an HRT of 3 h, the soluble fraction (size smaller than 1 kDa) obtained was 40% when nitrogen was

limiting, increasing to 70% and 60%, respectively, when it was supplied in sufficient amounts (12 mg/L). The acidification stage was not affected to the same extent.

4. The degradation efficiency of gelatin (20-25 kDa) in an ascending fluidized bed reactor was a function of the HRT conditions of the process. Therefore, when operating with a 12 h HRT, the fraction larger than 10 kDa was not hydrolyzed by the biomass while the 1-10 kDa fraction was fully metabolized, yielding an effluent with a 60% content of soluble molecules. Increasing HRT to 36 h improved the soluble fraction to 94% leaving approximately 5% of the larger size fraction.
5. The coupling of tangential ultrafiltration (UF) systems for the biodegradation of starch and of gelatin, allowed the production of a highly soluble effluent, rich in low molecular weight compounds, largely a mixture of acetate, propionate and butyrate. In the case of gelatin, OUR tests, indicated that the feed biodegradable fraction increased from 26% to 41% when the anaerobic digestion system included a pretreatment to a conventional activated sludge system, and reaching 53% when coupled to an UF unit.
6. The biomass generated in low temperature starch and gelatin degradation processes was able to form aggregates with sedimentation ability similar to that of methanogenic granules, although in the case of gelatin one could obtain only unstable and small aggregates. The alternating operation with deficient and adequate nitrogen concentration favored the formation of aggregates with a density increasing with calcium, improving significantly their sedimentation ability. The protein/total sugar fraction in the EPS represented adequately the biomass aggregation state, showing large values for not aggregated biomass (3-4) and values approaching 1 when the aggregation phenomena occurred.