

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
[] Escola Tècnica Superior d'Enginyeria
Departament d'Enginyeria Química



Degradación de disolventes orgánicos de uso industrial en un reactor anaerobio de lecho expandido

Programa de doctorado: Ingeniería Química, Ambiental y de Procesos
Departamento de Ingeniería Química

Memoria que, para optar al Título de
Doctor por la Universitat de València,
presenta **CARLOS LAFITA LÓPEZ**

Directores de tesis,
Dra. CARMEN GABALDÓN GARCÍA
Dr. JOSEP MANUEL PEÑARROCHA OLTRA

Valencia, enero de 2016

Dña. CARMEN GABALDÓN GARCÍA, Profesora Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat de València, y

D. JOSEP MANUEL PEÑARROCHA OLTRA, Profesor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat de València.

CERTIFICAN: Que **D. Carlos Lafita López**, con Título de Ciencias Ambientales, ha realizado bajo su dirección el trabajo que bajo el título de: **“DEGRADACIÓN DE DISOLVENTES ORGÁNICOS DE USO INDUSTRIAL EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LECHO EXPANDIDO”** presenta en esta Memoria y que constituye su Tesis para optar al Título de Doctor por la Universitat de València.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente certificado en Valencia a enero de 2016.

Fdo.: Dña. Carmen Gabaldón García

Fdo.: D. Josep M. Peñarrocha Oltra

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis Carmen Gabaldón y Josep Manuel Peñarrocha por la oportunidad que me brindaron de incorporarme a su grupo de investigación, así como por su esfuerzo, dedicación e implicación durante la elaboración de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a Vicente Martínez y Paula Marzal por sus buenos consejos y apoyo durante estos años.

Tampoco quiero dejar pasar la oportunidad de mostrar mi gratitud a la empresa Pure Air Solutions B.V. por invertir tanto esfuerzo para el desarrollo de nuevas tecnologías para que en el futuro podamos disfrutar de un aire más limpio.

Me gustaría expresar mi gratitud a los doctores Henri Spanjers y Jules van Lier por integrarme en su grupo de investigación durante 3 meses en la Delft University of Technology. También quiero hacer extensivo este agradecimiento a Julián Muñoz, por tantas horas compartidas en el laboratorio y por hacer más llevadera mi estancia.

También quiero agradecer a la empresa EXEL Composites N.V. por su amable acogida durante 3 meses en su factoría de Oudenaarde (Bélgica).

A mis compañeros de laboratorio durante estos años. A Feliu, por todo lo que me ha enseñado, por su buen humor y positivismo. A Javi, por enseñarme tantas cosas, tanto en el laboratorio como en los viajes a Soria, y por su disposición para ayudarte siempre que lo necesitas. A Marta, por su conocimiento, por sus consejos, por preocuparse y por las risas compartidas. A Jordi, por los buenos momentos vividos y los que quedan por vivir, aunque sea un “punxa”. A Mari Carmen y David, que seáis muy felices en el camino que habéis emprendido juntos. A Pau, porque tras estos años en lo que hemos compartido camino puedo decir que me llevo una buena amiga. A Kevin, por tu buen carácter y, por supuesto, por tus conocimientos en microbiología. A María, por las horas compartidas con los reactores. A Nadine y Dani, por los buenos momentos durante vuestra estancia en el laboratorio. Y a las nuevas incorporaciones, Pablo y Keisy, os deseo el mayor de los éxitos en esta etapa que habéis comenzado.

A mi familia, porque sin ellos no habría sido posible llegar hasta aquí.

A María, por responder con una sonrisa y mucha comprensión a tantas ausencias de estos últimos años, y darme ánimos cuando he necesitado, en definitiva, por estar ahí siempre.

Por último quiero agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad la beca concedida para la realización de la presente tesis.

Resumen

La contaminación atmosférica constituye actualmente una seria amenaza para el medio ambiente y la salud. En este sentido, las emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COV) pueden contribuir de forma importante a la contaminación atmosférica. Una gran parte de estos compuestos se emiten en procesos productivos en los que se utilizan disolventes, de forma que las industrias que realizan estas actividades han de reducir su emisión hasta los límites establecidos en la legislación mediante cambios en el proceso productivo, la sustitución de los disolventes empleados y, si es necesario, mediante el uso de una técnica de control que elimine este tipo de emisiones. En este sentido, las técnicas biológicas basadas en procesos aerobios se han mostrado eficaces para el tratamiento de las emisiones. Sin embargo, la elevada superficie requerida para su instalación a nivel industrial ha limitado su uso generalizado. Por ello, el desarrollo de una tecnología basada en la degradación anaerobia, que permita el tratamiento de cargas orgánicas mayores y la obtención de un subproducto con elevado poder energético como es el metano, se presenta como una alternativa más económicamente viable para el tratamiento de estas emisiones en algunos sectores industriales.

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado con el objetivo principal de estudiar la viabilidad del uso de un reactor anaerobio de lecho expandido para el tratamiento de un agua residual que contiene disolventes orgánicos provenientes del uso de tintas en la industria flexográfica. Los resultados obtenidos sientan las bases para la implantación de una nueva configuración para el control de las emisiones de COV de elevada solubilidad en agua, compuesta fundamentalmente por una torre lavadora y un reactor anaerobio.

Para llevar a cabo este estudio se ha abordado una línea de trabajo principal, en la que se evaluó la degradación anaerobia de diferentes mezclas de disolventes en reactores anaerobios de lecho expandido bajo diferentes condiciones de operación. En paralelo se desarrollaron tres líneas de trabajo secundarias con objeto de: estudiar la potenciación de la granulación del fango, optimizar la dosificación de nutrientes, e implantar la prueba de concepto.

En referencia a la línea principal, los ensayos bajo condiciones psicrófilas de 18 °C y mesófilas subóptima de 25 °C con una mezcla binaria compuesta por etanol y 1-metoxi-2-propanol se realizaron en dos reactores operados en paralelo, con aporte de sustrato continuo y discontinuo. En los ensayos llevados a cabo con aporte continuo de sustrato se realizó el seguimiento de los reactores durante 210 días de experimentación. En primer lugar se evaluó la adaptación de los

microorganismos a la temperatura de operación en la degradación de un sustrato de elevada biodegradabilidad como es el etanol, siendo la carga orgánica máxima tratada con eficacias de eliminación superiores al 90% de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹ y 30 kg DQO m⁻³ d⁻¹ para las temperaturas de 18 y 25 °C, respectivamente. Una vez adaptados a las condiciones ambientales, se alimentaron los reactores con una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol, disolvente de amplio uso industrial y para el que no había información bibliográfica respecto a su degradación anaerobia. Cuando el sistema fue capaz de degradar 1-metoxi-2-propanol, se evaluó el efecto que las condiciones ambientales y la carga orgánica tienen sobre la degradación de los disolventes. De este modo se obtuvieron tiempos de adaptación a 1-metoxi-2-propanol de 44 días en condiciones psicrófilicas y de 34 días bajo condiciones mesofílicas, relacionados con la ausencia en el inóculo de las enzimas encargadas de la ruptura del enlace éter. Tras el periodo de adaptación, las máximas cargas orgánicas de 1-metoxi-2-propanol que se lograron degradar con eficacias de eliminación superiores al 90% fueron de 6.1 y 9 kg DQO m⁻³ d⁻¹ a 18 y 25 °C, respectivamente.

En la industria se pueden producir interrupciones de la alimentación que pueden afectar al proceso de degradación anaerobia. En este sentido, se ha evaluado la influencia sobre el funcionamiento del sistema de un periodo de 1 mes sin aporte de sustrato. La reanudación de la operación con aporte de sustrato en continuo mostró la necesidad de un nuevo periodo de adaptación de la biomasa a 1-metoxi-2-propanol. Después de la readaptación del sistema, y a fin de evaluar el efecto del aporte discontinuo sobre la respuesta transitoria del sistema, ambos reactores se alimentaron de forma intermitente, con paradas nocturnas (8 horas sin alimentación) y de fin de semana (56 horas sin alimentación), simulando el patrón diario y semanal de la emisión asociado a los turnos de trabajo, que pueden ser de 1 a 3, durante 5 a 7 días, dependiendo de las necesidades de producción. Este régimen de operación resultó en un descenso en la capacidad de eliminación de 1-metoxi-2-propanol hasta 7.2 kg DQO m⁻³ d⁻¹ a 25 °C. La aplicación de cargas orgánicas elevadas bajo condiciones de aporte intermitente de sustrato conllevó la desgranulación parcial de la biomasa, siendo ésta una de las problemáticas a solucionar para la implantación a nivel industrial de esta tecnología.

Esta parte del trabajo de tesis doctoral relacionada con la degradación anaerobia de una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol ha sido publicado en:

Lafita, C., Peña-roja, J.M., Gabaldón, C., 2015. Anaerobic degradation of 1-methoxy-2-propanol under ambient temperature in an EGSB reactor. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 38, 2137-2146.

El estudio sobre la degradación anaerobia de la mezcla binaria de disolventes se completó con el análisis de las poblaciones microbianas a lo largo de la operación en ambos reactores, para lo cual se implementaron y pusieron a punto técnicas de biología molecular como el análisis de electroforesis con gradiente desnaturalizante y posterior aislamiento y secuenciación de las bandas obtenidas. Los resultados de estos análisis permitieron identificar las principales especies microbianas presentes en cada reactor, su evolución a lo largo de la operación y las similitudes entre las poblaciones de los dos reactores anaerobios operados bajo condiciones ambientales diferentes. Estos mostraron una mayor biodiversidad en el dominio *Bacteria*, así como una similitud entre las comunidades microbianas identificadas en ambos reactores, lo que indica el establecimiento de una comunidad de microorganismos mesofílicos psicotolerante en el reactor operado a 18 °C. Entre los microorganismos identificados destacó la presencia de aquellos del género *Acetobacterium*, que se encuentran relacionados con la producción de enzimas necesarias para romper los enlaces éter en los éteres glicólicos, como el que se encuentra en 1-metoxi-2-propanol.

La composición de las mezclas de disolventes utilizada en la industria flexográfica depende del acabado deseado, conteniendo normalmente compuestos oxigenados como etanol, acetato de etilo, acetona, 1-metoxi-2-propanol e isopropanol. Por este motivo se llevó a cabo un ensayo en un reactor anaerobio operado a 25 °C con un sustrato que contenía una mezcla multicomponente compuesta por estos disolventes, siendo mayoritarios etanol y acetato de etilo. En este ensayo se determinó, durante la puesta en marcha, el tiempo necesario para la adaptación de los microorganismos a los compuestos presentes en la mezcla, observándose la necesidad de un periodo de 41 días para la degradación de isopropanol y 1-metoxi-2-propanol. Una vez alcanzada una operación estable, se observó que el sistema podía tratar con una eficacia de eliminación mayor al 98% una carga orgánica de 45 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Posteriormente, se realizó un cambio en la composición de la mezcla, utilizando acetato de etilo como compuesto mayoritario en lugar de etanol, obteniendo también elevadas eficacias de eliminación, mostrando la posibilidad de tratar las diferentes mezclas de disolventes que pueden generarse como consecuencia de diferentes necesidades de producción en la aplicación industrial, siempre y cuando se apliquen bajas cargas orgánicas de aquellos disolventes que precisan de un tiempo de adaptación para su degradación, como son isopropanol y 1-metoxi-2-propanol.

Las líneas de trabajo secundarias desarrolladas en paralelo a la principal comprendieron el estudio de la granulación del fango anaerobio, el efecto de la adición de micronutrientes en la degradación anaerobia y la prueba de concepto a escala de laboratorio.

La desgranulación puede producirse por varios motivos, como por ejemplo la sobrecarga orgánica del sistema, dando lugar a la pérdida de biomasa del interior del reactor, lo que conlleva la necesidad de reemplazar la biomasa, necesitando un nuevo periodo de adaptación de los microorganismos a las condiciones ambientales y de sustrato. Una alternativa consiste en llevar a cabo una potenciación de la granulación del fango hasta alcanzar de nuevo la morfología granular deseada. Para estudiar el proceso de granulación, se realizaron varios ensayos en base a dos estrategias: reducción de la velocidad superficial y su combinación con la adición de floculante. Los floculantes estudiados fueron quitosan, un polímero natural, y aluminio. Este trabajo experimental permitió comprobar que el descenso de la velocidad superficial a valores inferiores a 1 m h^{-1} es el factor más importante en la potenciación de la granulación de un fango parcialmente desgranulado. Los resultados indicaron que la adición de floculantes no resultó particularmente beneficiosa para cultivos parcialmente desgranulados. Esto es, probablemente, debido a que no desaparecen completamente en el fango parcialmente desgranulado por sobrecarga orgánica.

La presencia de micronutrientes es fundamental para la actividad de los microorganismos implicados en las rutas metabólicas de degradación anaerobia, aunque una dosificación excesiva puede causar la inhibición del proceso. Es por ello que se realizó un estudio del efecto que tiene la adición de metales pesados sobre la actividad metanogénica. Este estudio se realizó durante una estancia de investigación de 3 meses en la Delft University of Technology (Países Bajos) bajo la supervisión del profesor Dr. Henri Spanjers, con la que se opta a la Mención Internacional del título de Doctor. En concreto, en este trabajo se evaluó la influencia de diferentes concentraciones sobre la actividad metanogénica específica presentada por la biomasa de dos compuestos de cobalto, cloruro de cobalto y vitamina B₁₂, y tungsteno mediante ensayos en reactores en discontinuo sobre un agua residual de elevada salinidad con una mezcla compuesta por acetato sódico y fenol. También se evaluó la biodisponibilidad de estos metales mediante el estudio de su distribución en la biomasa a partir de su extracción secuencial, lo que mostró que el contenido en metales del fango utilizado en este estudio era suficiente para asegurar una buena actividad metanogénica. En el caso del cobalto, la mayor biodisponibilidad en forma de vitamina B₁₂ produjo la

inhibición de la actividad metanogénica con menores concentraciones de este metal en el medio, por lo que se recomienda el uso de CoCl_2 para su dosificación. En cuanto al papel del tungsteno, la biomasa inóculo presentó una concentración suficiente para asegurar la máxima actividad metanogénica. La dosificación de concentraciones superiores a 1 mg l^{-1} produjo la acumulación de este metal en la fracción intercambiable, lo que conllevó el descenso en la actividad microbiana. Estos resultados muestran que la dosificación óptima de metales se ha de determinar en estudios ad-hoc en función de la naturaleza química del agua residual a tratar y del inóculo utilizado.

A partir de los resultados obtenidos, se implementó la prueba de concepto a escala de laboratorio de un biolavador anaerobio de lecho granular para el tratamiento de una emisión de COV de elevada solubilidad en agua, utilizando como compuesto de referencia etanol. Este ensayo permitió ultimar la definición del concepto para su posterior diseño a escala de planta piloto, permitiendo establecer la forma de acoplar las operaciones y los procesos implicados en el sistema. A escala de laboratorio, con una alimentación de contaminante en aire de 1.9 g h^{-1} y una transferencia al agua superior al 80%, lo que corresponde a una carga orgánica de $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el reactor anaerobio, se alcanzaron eficacias de eliminación superiores al 94%.

Summary

Nowadays air pollution is a serious threat to the environment and health. In this regard, emissions of volatile organic compounds (VOCs) can contribute significantly to air pollution. A large proportion of these compounds is emitted by production processes using solvents. Therefore industries performing these activities have to reduce their emissions to limits established by legislation. Air pollution legal limits can be met by making changes in the production process, replacing solvents and, if necessary, by using a treatment to reduce emissions. In this regard, aerobic biotreatments have been proven effective for treating VOC emissions. However, widespread use of biotechniques has been limited by the high footprint needed. Therefore, the development of a technology based on anaerobic degradation, which is able to treat larger organic loads and produce a by-product with high energy content as methane, could become a more economically viable alternative for the treatment of VOC emissions in some industrial sectors.

This doctoral thesis has been developed with the main objective of studying the feasibility of using an anaerobic expanded granular sludge bed reactor for treating wastewater containing organic solvents coming from ink used in the flexographic industry. The obtained results lay the foundations of a novel configuration for controlling water-soluble VOC emissions, consisting essentially of a scrubber and an anaerobic reactor.

The main line of research was the evaluation of anaerobic degradation of different mixtures of solvents in expanded granular sludge bed anaerobic reactors under different operating conditions. In parallel, three secondary lines of work were developed in order to study the enhancement of biomass granulation, the optimization of the nutrient dosage and the implementation of the proof of concept.

Within the main line of work, experiments under psychrophilic conditions at 18 °C and suboptimal mesophilic conditions at 25 °C were carried out. A binary mixture composed of ethanol and 1-methoxy-2-propanol in two reactors operated in parallel was applied, with continuous and discontinuous substrate supply. Under continuous substrate supply, the reactors' performance was monitored over 210 days. First, the period of adaptation of micro-organisms to the operating temperature during the degradation of a highly biodegradable substrate as ethanol was assessed. Maximum organic loading rates applied to achieve removal efficiencies higher than 90% were 20 kg COD m⁻³ d⁻¹ and 30 kg COD m⁻³ d⁻¹ at 18 and 25 °C, respectively. Once reactors were adapted to environmental conditions, a mixture of ethanol and 1-methoxy-2-propanol, a solvent with broad industrial

use and without any information about its anaerobic degradation, was used. Once the system was able to degrade 1-methoxy-2-propanol, the effect of environmental conditions and the organic loading rate on solvent degradation was evaluated. Periods of adaptation to 1-methoxy-2-propanol of 44 days under psychrophilic conditions and 34 days under mesophilic conditions were observed. Adaptation periods are related to the absence in the inoculum of enzymes responsible for enzymatic cleavage of glycol ether bonds. 1-methoxy-2-propanol removal efficiencies higher than 90% were achieved with maximum organic loading rates of 6.1 and 9 kg COD m⁻³ d⁻¹ at 18 and 25 °C, respectively.

At industrial facilities, substrate supply interruptions can occur and may affect anaerobic degradation. Accordingly, the influence on the system performance of one month without substrate supply was evaluated. The resumption of the operation, with continuous substrate supply, showed the need for a new period of adaptation of biomass to 1-methoxy-2-propanol. After the readaptation of the system and for the purpose of evaluating the effect on transient response of discontinuous substrate supply, intermittent feeding was applied to both reactors. Substrate supply interruptions during nights (8 hours without feeding) and weekends (56 hours without feeding) were used in order to simulate daily and weekly substrate supply interruptions associated with manufacturing shift work, which is usually established as from 1 to 3 shifts per day, for from 5 to 7 days per week, depending on factory production. This operating regime resulted in a decline in 1-methoxy-2-propanol elimination capacity to 7.2 kg COD m⁻³ d⁻¹ at 25 °C. The combination of high organic loading rates and intermittent substrate supply was the cause of partial degranulation of biomass, a problem to be solved for industrial application of this technology.

Some results related to the anaerobic degradation of a mixture of ethanol and 1-methoxy-2-propanol presented in this part of the doctoral thesis have been published in the following manuscript:

Lafita, C., Peña-roja, J.M., Gabaldón, C., 2015. Anaerobic degradation of 1-methoxy-2-propanol under ambient temperature in an EGSB reactor. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 38, 2137-2146.

The study on anaerobic degradation of a binary mixture of solvents was completed with the analysis of the microbial community during the operation of both reactors. Molecular biology tools, such as denaturing gradient gel electrophoresis and subsequent band isolation and sequencing, were implemented and optimized. The data obtained permitted the identification of main species in each reactor, the comparison between microbial populations of

both reactors operating under different environmental conditions and the assessment of microbial population dynamics throughout the experiment. The obtained results indicated higher biodiversity in the *Bacteria* domain, as well as a similarity between the microbial communities identified in both reactors, indicating the prevalence of a psychrotolerant mesophilic community in the reactor operating at 18 °C. Based on the identified micro-organisms, the presence of species from the genus *Acetobacterium* is reported to be related to the production of enzymes responsible for glycol ether bond cleavage, a chemical bond found in 1-methoxy-2-propanol.

The composition of solvent mixtures used in flexographic industry facilities depends on each specific product being obtained, but usually they contain oxygenated compounds such as ethanol, ethyl acetate, acetone, 1-methoxy-2-propanol and isopropanol. For this reason, a substrate containing a multicomponent mixture composed of these solvents, with ethanol and ethyl acetate as main compounds, was conducted in an anaerobic reactor operating at 25 °C. During the start-up, the period of adaptation of micro-organisms to compounds present in the mixture was determined, and the need for 41 days for degradation of isopropanol and 1-methoxy-2-propanol was discovered. Once stable performance was accomplished, the system was able to treat organic loading rates of 45 kg COD m⁻³ d⁻¹ with removal efficiencies higher than 98%. Then, the composition of the solvent mixture was changed to one with ethyl acetate as the main compound instead of ethanol. This new influent composition resulted in elevated removal efficiencies. This shows the feasibility of treating different solvent mixtures that can be generated as a consequence of production needs in industrial applications, as long as low organic loading rates of solvents that require an adaptation period for their removal, such as isopropanol and 1-methoxy-2-propanol, are present in the influent.

Secondary lines of work were developed in parallel to the main study. These were the study of the granulation of anaerobic sludge, the effect on anaerobic degradation of the addition of micronutrients and the proof of concept at the laboratory scale.

Degranulation may occur for several reasons, for instance organic overload of the system, leading to loss of biomass from the reactor. That results in the need to replace the biomass, requiring a new period of adaptation of micro-organisms to environmental and substrate conditions. An alternative method is to enhance sludge granulation in order to obtain the desired granular morphology. The granulation process was studied by testing two different strategies: decrease of

upflow velocity and its combination with the addition of flocculants. A natural polymer, chitosan, and a trivalent cation, aluminium, were the flocculants tested. The decrease in upflow velocity to values below 1 m h^{-1} was confirmed as the best strategy to enhance granulation of partially degranulated sludge. Results also indicated that there is no improvement of granulation in the presence of flocculants, probably due to the fact that nucleation centres do not disappear during the degranulation process.

Another issue was the study of the effect on the methanogenic activity of the addition of heavy metals as micronutrients during the treatment of wastewater with a mixture of organic pollutants. This study was carried out under the supervision of Associate Professor Dr. Henri Spanjers at the Technical University of Delft (Netherlands) over a research stay of three months and enabled me to apply for international mention in the PhD degree. Micronutrients are essential for the activity of micro-organisms involved in anaerobic degradation, however excessive dosage may cause inhibition of the process. The effect of different concentrations of two compounds of cobalt, cobalt chloride and vitamin B₁₂, and tungsten on methanogenic activity was assessed. These assays were carried out with high-salinity wastewater and a mixture of sodium acetate and phenol as substrate. The bioavailability of these metals was also evaluated by studying their distribution in biomass by using a sequential extraction procedure. In this study, the metal content initially present in sludge was sufficient to ensure good methanogenic activity. The higher bioavailability of vitamin B₁₂ caused the inhibition of methanogenic activity with lower cobalt concentration in the matrix compared to the CoCl₂ test, so the use of CoCl₂ for cobalt dosing is recommended. Maximum methanogenic activity was ensured with a biomass tungsten content of $70 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ST}$, but even with this concentration in sludge, the presence of this metal in the exchangeable fraction produced a decline in microbial activity. These results lay the foundation of the study on dosage optimization of metals and also indicate that these studies should be carried out ad hoc for wastewater to be treated and inoculum.

Finally, the proof of the concept of the anaerobic scrubber was implemented for the treatment of emission into the air of water-soluble VOC using ethanol as reference compound. The results obtained from this assay have been used for designing the system at pilot plant scale. At laboratory scale, satisfactory pollutant treatment was accomplished with an inlet load of 1.9 g C h^{-1} . A mass transfer efficiency of 80% in the scrubber, which corresponds to an organic loading rate in the anaerobic reactor of $20 \text{ kg COD m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, resulted in the anaerobic mineralization of more than 94% of solvent.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Tecnologías actuales para el control de las emisiones de COV	9
1.2	Tratamiento anaerobio de lecho granular	13
1.2.1	Etapas del proceso microbiológico y bioquímico	13
1.2.2	Microbiología de los tratamientos anaerobios	20
1.2.3	Influencia de los parámetros ambientales y de control	23
1.2.3.1	Efecto de los parámetros ambientales.....	23
1.2.3.2	Efecto de los parámetros de control.....	28
1.2.4	Proceso de granulación en reactores anaerobios de lecho granular	29
1.2.5	Reactores anaerobios de lecho granular	35
1.2.6	Aplicación de los procesos anaerobios a la degradación de disolventes orgánicos	40
1.3	Tratamiento anaerobio como tecnología para el control de las emisiones de COV.....	49
2	OBJETIVOS.....	51
3	MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1	Montaje experimental	59
3.1.1	Reactor anaerobio RALF a escala de laboratorio.....	59
3.1.2	Biolavador anaerobio de lecho granular a escala de laboratorio..	60
3.2	Propiedades de los disolventes utilizados en este estudio	62
3.3	Composición de nutrientes.....	64
3.3.1	Reactor anaerobio de lecho fluidizado.....	64
3.3.2	Biolavador anaerobio de lecho granular	65
3.4	Propiedades de los coagulantes utilizados en este estudio	65
3.4.1	Aluminio.....	65
3.4.2	Chitosan	66
3.5	Técnicas analíticas utilizadas en este estudio	66
3.5.1	Determinación de la concentración de DQO, del carbono orgánico total, carbono inorgánico y carbono total.....	67
3.5.2	Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles.....	67
3.5.3	Determinación del contenido en sólidos.....	68
3.5.4	Determinación de la concentración de nutrientes.....	68
3.5.5	Determinación de la composición de las mezclas de COV	69

3.5.6	Determinación de la concentración total de COV en la fase gas mediante análisis de hidrocarburos totales	69
3.5.7	Determinación de la producción y composición de biogás.....	70
3.5.8	Ensayos en reactores en discontinuo	70
3.5.9	Distribución del tamaño de partícula	72
3.5.10	Medición de la turbidez.....	73
3.5.11	Ensayos cinéticos de bioadsorción de cobalto	73
3.5.12	Análisis del contenido de metales de la biomasa.....	75
3.5.13	Estudio de las poblaciones microbianas.....	76
4	DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE UNA MEZCLA BINARIA DE ETANOL Y 1-METOXI-2-PROPANOL.....	81
4.1	Plan de trabajo.....	84
4.1.1	Puesta en marcha de los reactores RALF.....	85
4.1.2	Degradación anaerobia de una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol en condiciones mesofílicas y psicofílicas	85
4.1.3	Evaluación de la respuesta del reactor RALF a una interrupción prolongada en el suministro de sustrato.....	86
4.1.4	Respuesta dinámica de los reactores RAFL al suministro cíclico del sustrato orgánico.....	87
4.1.5	Estudio del potencial bioquímico de metano y la actividad metanogénica específica	89
4.1.6	Evolución de las poblaciones microbianas	90
4.2	Resultados y discusión	90
4.2.1	Puesta en marcha de los reactores RALF.....	90
4.2.2	Degradación anaerobia de una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol en condiciones mesofílicas y psicofílicas	97
4.2.3	Evaluación de la respuesta del reactor RALF a una interrupción prolongada en el suministro de sustrato.....	105
4.2.4	Respuesta dinámica de los reactores RALF al suministro cíclico del sustrato orgánico.....	112
4.2.5	Respuesta dinámica de los reactores RAFL tras la reanudación del aporte de sustrato tras su corte en los periodos nocturnos y de fin de semana	118
4.2.6	Estudio de la actividad metanogénica específica y del potencial bioquímico de metano	122
4.2.7	Evolución de las poblaciones microbianas	123
4.2.7.1	Poblaciones de Bacteria	123
4.2.7.2	Poblaciones de Archaea	128

4.3 Conclusiones	132
5 DEGRADACIÓN DE UNA MEZCLA DE DISOLVENTES EN CONDICIONES MESOFÍLICAS	135
5.1 Plan de trabajo	137
5.1.1 Puesta en marcha del reactor RALF.....	138
5.1.2 Influencia de la carga orgánica en la degradación anaerobia de una mezcla de disolventes en un reactor RALF	138
5.1.3 Influencia del cambio de composición en etanol y acetato de etilo en un reactor RALF con un sustrato multicomponente	139
5.2 Resultados y discusión	140
5.2.1 Puesta en marcha del reactor RALF.....	140
5.2.2 Influencia de la carga orgánica en la degradación anaerobia de una mezcla de disolventes en un reactor RALF	144
5.2.3 Influencia del cambio de composición en etanol y acetato de etilo en un reactor RALF con sustrato multicomponente	148
5.3 Conclusiones	151
6 POTENCIACIÓN DE LA GRANULACIÓN MEDIANTE EL USO DE FLOCULANTES: ALUMINIO Y CHITOSAN	153
6.1 Plan de trabajo	155
6.1.1 Aluminio.....	156
6.1.1.1 Operación de los reactores RALF.....	156
6.1.2 Chitosan	157
6.1.2.1 Ensayo jar-test	157
6.1.2.2 Operación de reactores RALF	158
6.1.2.3 Estudio del potencial bioquímico del metano y de la actividad metanogénica específica	159
6.2 Resultados y discusión	160
6.2.1 Aluminio.....	160
6.2.1.1 Evolución del tamaño del gránulo	160
6.2.1.2 Evaluación del funcionamiento de los reactores RALF	163
6.2.2 Chitosan	164
6.2.2.1 Caracterización del fango inicial.....	165
6.2.2.2 Ensayo jar-test	165
6.2.2.3 Evolución de la granulación de reactores RALF.....	167
6.2.2.4 Evaluación del funcionamiento de los reactores RALF	174

6.2.2.5 Estudio de la actividad metanogénica específica y del potencial bioquímico del metano.....	179
6.3 Conclusiones	180
7 INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE COBALTO Y TUNGSTENO EN LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE DISOLVENTES ORGÁNICOS.....	183
7.1 Plan de trabajo.....	186
7.1.1 Estudio cinético de bioadsorción de cobalto.....	186
7.1.2 Efecto de la dosificación de cobalto y de tungsteno sobre la actividad metanogénica	187
7.2 Resultados y discusión	188
7.2.1 Caracterización del fango inicial	188
7.2.2 Estudio cinético de bioadsorción de cobalto.....	189
7.2.3 Efecto de la adición de cobalto y tungsteno en la actividad metanogénica	193
7.3 Conclusiones	197
8 PRUEBA DE CONCEPTO: APLICACIÓN BIOLAVADOR ANAEROBIO DE LECHO GRANULAR PARA LA ELIMINACIÓN DE COV EN EMISIONES DE AIRE DE LA INDUSTRIA FLEXOGRÁFICA	199
8.1 Plan de trabajo.....	202
8.2 Resultados y discusión	203
8.3 Conclusiones	207
9 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	209
10 CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES.....	215
11 NOMENCLATURA	221
12 BIBLIOGRAFÍA.....	227

1 INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica constituye actualmente una seria amenaza para el medio ambiente y la salud. El desarrollo experimentado por la humanidad desde la Revolución Industrial ha supuesto un mayor consumo de los recursos naturales, provocando que en la mayoría de las de actividades, ya sean económicas o sociales, se emitan contaminantes atmosféricos. La contaminación atmosférica se define según Wark *et al.* (1998) como:

“La presencia en la atmósfera de uno o más contaminantes o sus combinaciones, en cantidades tales y con tal duración que sean o puedan afectar la vida humana, de animales, de plantas, o de la propiedad que interfiera el goce de la vida, la propiedad o el ejercicio de las actividades.”

El empeoramiento de la calidad del aire, especialmente en las zonas más industrializadas, contribuye a producir efectos adversos sobre la salud humana y los ecosistemas. Los efectos sobre la salud humana fueron estimados en 2012 por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) en un informe que reveló que la morbilidad derivada de la contaminación atmosférica en las ciudades y zonas rurales de todo el mundo provoca 3.7 millones de defunciones prematuras anuales, por lo que representa actualmente uno de los mayores riesgos sanitarios mundiales. Los principales efectos producidos sobre los ecosistemas son (AEMA, 2014):

- Menor crecimiento de la vegetación en los ecosistemas y en la agricultura, así como la pérdida de biodiversidad, que se produce por los efectos de la deposición de compuestos sobre el suelo como azufre y nitrógeno.
- Eutrofización derivada del exceso de nutrientes por la deposición de compuestos nitrogenados.
- Toxicidad de los metales depositados en el medio.

Según su naturaleza los contaminantes atmosféricos se pueden clasificar como físicos, siendo los más representativos la contaminación acústica, la radiación electromagnética o la radioactiva; o químicos. En referencia a los contaminantes químicos se pueden diferenciar dos grandes grupos: contaminantes primarios y contaminantes secundarios. Los contaminantes primarios son aquellos que se emiten de forma directa a la atmósfera, mientras que los secundarios se forman a partir de la interacción de otros compuestos. En la Directiva 2010/75/UE de 24 de noviembre sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación), en su Anexo II, se recogen en un listado las sustancias contaminantes de la atmósfera. Entre estas sustancias se encuentran

4 | Introducción

los compuestos orgánicos volátiles (COV) que, según esta el artículo 3 de esta directiva, se definen como:

“Compuesto orgánico volátil es todo compuesto orgánico, así como la fracción de creosota, que tenga a 293.15 K una presión de vapor de 0.01 kPa o más, o que tenga una volatilidad equivalente en las condiciones particulares de uso.”

Dentro de este grupo de contaminantes se puede distinguir, en función de los diferentes efectos que tienen en el medio ambiente, entre compuestos orgánicos volátiles distintos del metano (COVNM) y metano (CH₄). El metano, debido a su capacidad de absorción de la radiación infrarroja, contribuye al incremento del efecto invernadero, teniendo un potencial de calentamiento global 25 veces superior al del dióxido de carbono. Por otro lado, los efectos de los COVNM sobre el medio ambiente son:

- Efectos nocivos sobre la salud humana y los ecosistemas debido a su toxicidad.
- Desperfectos y corrosión de materiales.
- Olores.
- Precursores, al oxidarse, de partículas menos volátiles, que forman aerosoles orgánicos secundarios (AOS).
- Precursores de la formación de ozono troposférico.

Este último es uno de los principales problemas de contaminación atmosférica que presentan los COV y se produce por la reacción de estos compuestos con óxidos de nitrógeno (NO_x) en presencia de luz solar. El ozono troposférico y otros contaminantes forman el llamado “smog” fotoquímico, que es el responsable de la niebla color marrón presente en muchas ciudades. Esta niebla causa efectos adversos sobre la salud humana, los ecosistemas y causa baja visibilidad. La formación del ozono troposférico se encuentra favorecida por la elevada densidad del tráfico de vehículos a motor (fuente móvil de emisión de los NO_x), cielos despejados, elevadas temperaturas, ausencia de viento o inversión térmica, que provoca la acumulación en capas bajas de la atmósfera de aire cálido y contaminantes (Vallero, 2006).

Las emisiones de COVNM en la UE-28 se encuentran en descenso desde 1990, habiéndose reducido por debajo de 8848 Gg COVNM en el año 2007. El mayor descenso de las emisiones se produjo entre los años 2003 y 2012, siendo el sector del transporte el que experimentó una mayor reducción (63%), seguido del

uso de disolventes y otros productos (18%), industria (18%) y energía (9%) (AEMA, 2014). En España las emisiones de COVNM mostraron una relativa estabilidad hasta el año 1998 con una tendencia descendente posterior, principalmente asociada al sector del transporte (88.2%).

Centrándonos en la problemática industrial, que supone la mitad de la emisión total de COVNM en la UE-28 (AEMA, 2014), las fuentes más frecuentes de COVNM proceden del uso de disolventes y otros productos, siendo este conjunto de industrias el responsable en 2012 del 44% de las emisiones industriales totales de COVNM en la Unión Europea (UE-28) (AEMA, 2014). En España, el uso de disolventes y otros productos es el sector que presenta mayor emisión de COVNM, representando un 57.8% del total de las emisiones en el año 2011, y aún considerando que la reducción de la emisión en este sector fue de un 22.5% entre los años 2007 y 2011 (MAGRAMA, 2013). Dentro de esta categoría se encuentra el sector flexográfico que, según el Anexo VII Parte 1 de la Directiva 2010/75/UE, se trata del *“proceso de impresión que utiliza un portador de imagen de caucho o fotopolímeros elásticos en que las tintas de imprenta están por encima de las zonas de no impresión, utilizando tintas líquidas que se secan por evaporación”*. Las características de este tipo de impresión que permiten el uso de cualquier tipo de material, como plástico, films metálicos, celofán o papel, hace que sea ampliamente utilizado para la impresión sobre superficies no porosas utilizadas normalmente para el empaquetado de alimentos. Las tintas líquidas convencionales utilizadas en este sector se fabrican a partir de barnices y disolventes, que favorecen el secado por la evaporación de los compuestos orgánicos volátiles. Los disolventes de las tintas líquidas utilizados en la flexografía pueden alcanzar concentraciones de hasta un 65% y pueden ser alcoholes, naftas alifáticas, ésteres, cetonas, éteres, glicoles e hidrocarburos aromáticos (Generalitat de Catalunya, 2005). A parte de en las tareas de pintado, también se emiten COVNM en otras actividades asociadas con la flexografía como la limpieza y el almacenamiento y manipulación de las materias primas que contienen disolventes orgánicos (MAGRAMA, 2014).

Como alternativa al uso de tintas en base disolvente en la industria flexográfica, existe la posibilidad del uso de tintas en base agua (The Massachusetts Toxics Use Reduction Institute, 1994). Esta alternativa no permite la eliminación por completo de los disolventes en las tintas, que contienen bajas concentraciones de alcoholes, por lo que su uso no está prácticamente implantado en la actualidad. La impresión con este tipo de tintas supone una reducción en los riesgos para los trabajadores, en los requerimientos para el control de las emisiones y en los costes asociados a la eliminación de los residuos de las tintas en

base disolvente. La calidad obtenida en el producto final con el uso de estas tintas es similar al de utilizar tintas en base disolvente, aunque supone un menor brillo en la impresión sobre una superficie porosa. Las mayores desventajas en el uso de esta alternativa es la necesidad de limpiar los equipos más frecuentemente, la posible necesidad de realizar nuevas inversiones para adaptar la maquinaria y mayor uso de energía para favorecer el secado.

Marco legislativo

Debido a la condición de recurso vital que posee la atmósfera y por los daños que de por su contaminación pueden derivarse para la salud humana y el medio ambiente, la calidad del aire y el control de la contaminación atmosférica vienen siendo líneas principales en la actuación en la política medioambiental de la Unión Europea. En este sentido, la protección al medio ambiente viene determinada en el Título VII del Acta Única Europea (1986), en el que se establecen como principios básicos en los que se basa la política medio ambiental de los países Miembro, que son: principio de acción preventiva, principio de corrección, preferentemente en la fuente misma, de los ataques al medioambiente y principio de “quien contamina paga”.

La regulación de la emisión de COV en la industria viene recogida en la Directiva 2010/75/EU, de 24 de noviembre de 2010, sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación), que sustituye a la Directiva 96/61/EC, de 24 de septiembre. Esta Directiva, al igual que su predecesora, se encuentra inspirada en los principios de precaución y de “quien contamina paga”. También mantiene el planteamiento integrado de la prevención y control de las emisiones a la atmósfera, suelo y agua, la gestión de los residuos, la eficiencia energética y la prevención de accidentes. Este planteamiento integrado tiene como objetivo la minimización de la transferencia de contaminación de un ámbito del medio ambiente a otro, con el fin de proteger el medio ambiente en su conjunto. Esta nueva Directiva supone una respuesta a la necesidad de obtener mejoras ambientales asegurando la rentabilidad y el fomento de la innovación técnica, proporcionando incentivos para la innovación técnica y apoyando la creación de mercados de vanguardia. Además, hace más estrictos los valores límite de emisión (VLE) de algunas actividades en función de las mejores técnicas disponibles (MTD) e introduce los requisitos mínimos relativos a la inspección y control.

Las modificaciones introducidas por la Directiva 2010/75/EU se han transpuesto a la legislación española en la Ley 5/2013, de 11 de junio, que modifica a la existente ley de prevención y control integrados de la contaminación,

Ley 16/2002, de 1 de julio. Esta normativa está desarrollada en el Reglamento recogido en el RD 815/2013 para su ejecución, que es aplicable a las instalaciones industriales recogidas en su Anejo I. Entre las instalaciones recogidas en este Anejo se encuentran las instalaciones para tratamiento de superficie de materiales, de objetos o productos con utilización de disolventes orgánicos con una capacidad de consumo de más de 150 kg de disolvente por hora o más de 200 toneladas al año. Dichas instalaciones, en cumplimiento del principio de prevención que inspira la Ley, deberán de disponer de la autorización ambiental integrada (AAI) para la realización de sus actividades. Esta autorización integra y coordina los procedimientos y autorizaciones existentes antes de la Ley 16/2002, coordinando a los organismos implicados en su concesión. Las medidas a adoptar para el control de las emisiones han de quedar reflejados en la AAI, teniendo que cumplir las empresas uno de los requisitos reflejados en el artículo 59 de la Directiva 2010/75/EU. El primero de los supuestos es que se definan los valores límite de emisión de los contaminantes específicos de la actividad a realizar, que se recogen en el Anexo VII Parte 2 de la Directiva 2010/75/EU, junto con los umbrales de consumo de disolvente y los valores límite de emisión fugitiva; y la tecnología que se va a emplear en el control de las emisiones. Esta última parte ha de estar basada en las MTD y ha de ser revisada dentro de los cuatro años siguientes a la publicación del documento de referencia de las MTD. La otra alternativa es la realización de un sistema de reducción, siempre y cuando se consiga una reducción de emisiones equivalente en comparación con la alcanzada con la aplicación de los valores límite de emisión.

El principio de “quien contamina paga”, en el caso de los contaminantes atmosféricos, se ve reflejado en las sanciones derivadas del incumplimiento de esta Directiva. Las sanciones son establecidas por los países Miembro y, en el caso español se encuentran recogidas en la Ley 5/2013, de 11 de junio. En esta Ley se recogen, en su artículo 29, los motivos y cuantías de las sanciones a aplicar. Además, expone que las Comunidades Autónomas son las competentes para adoptar medidas cautelares y de control e inspección, así como para ejercer la potestad sancionadora y garantizar el cumplimiento de los objetivos de la Ley, así como el desarrollo reglamentario de la misma.

Otro de los principios que rigen la legislación ambiental en los países de la Unión Europea es el de transparencia informativa, que apoya el acceso de los ciudadanos a la información sobre la situación y evolución del medio ambiente en relación con las tendencias sociales, económicas y de salud, tal y como se refleja en el sexto programa de acción comunitario en materia de medio ambiente aprobado mediante la Decisión nº 166/2002/EC. En lo relativo a las actividades

recogidas en el Anexo VII Parte 1 de la Directiva 2010/75/EU, el proceso de información pública se encuentra determinado en el artículo 72, apartado 1 y se regula por el Reglamento (EC) nº 166/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de enero de 2006, relativo al establecimiento de un registro europeo de emisiones y transferencia de contaminantes. Este Reglamento dictamina que la vía adecuada para informar al público sobre las emisiones de contaminantes es a través de los registros de emisiones y transferencia de contaminantes (PRTR) y recoge el contenido de los mismos. Los PRTR deben ser realizados por los Estados miembro con una periodicidad de 3 años. En este sentido, en la legislación nacional, el suministro de la información de calidad ambiental se regula mediante el RD 508/2007, de 20 de abril. En el Anejo I de este Real Decreto vienen recogidas las categorías de actividades industriales incluidas en el Anejo 1 de la Ley 16/2002 y aquellas que no están sometidas al régimen administrativo de dicha Ley. Este Anejo ha sido modificado por el Anejo 5 del RD 815/2013 con el fin de adecuar la codificación basada en el Reglamento (EC) nº 166/2006.

Este marco legislativo desarrollado conduce a la reducción de las emisiones de COVNM mediante la implantación de sistemas para el control de la emisión de COVNM en los sectores industriales implicados. En este sentido se aprobó la Directiva 2001/81/EC del Parlamento y del Consejo, de 23 de octubre de 2001, sobre techos nacionales de emisión de determinados contaminantes atmosféricos. Esta directiva es consecuencia de uno de los primeros convenios internacionales, el Convenio de Ginebra sobre la contaminación transfronteriza a larga distancia de 1979 y el posterior Protocolo de Gotemburgo de 1999, actualizado en el año 2012, donde los estados de la Unión Europea, del centro y este de Europa, Canadá y Estados Unidos acordaron una serie de medidas para el control de las emisiones de contaminantes acidificantes y eutrofizantes y de precursores de ozono. En su transposición al derecho español en la Resolución de 14 de enero de 2008, por el que se aprueba el II Programa Nacional de Reducción de Emisiones, en el que se fijaron dos techos de emisión de COVNM para el año 2010 en función de la población: 662 kilo toneladas para la previsión de una población de 40.57 millones o de 742 kilo toneladas si la población fuera de 45.5 millones. En la revisión del acuerdo de Gotemburgo se ha establecido que el límite de emisión de COV en el estado español sea de 662 kilo toneladas para el año 2020, lo que supone una reducción del 22% respecto a la emisión del año 2005 (809 kilo toneladas). Según el Inventario de Emisiones elaborado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en enero de 2015, los techos de emisión de COVNM se han cumplido desde el año 2010 en adelante, alcanzando los objetivos propuestos. El margen respecto al límite de emisión ha ido

aumentando desde el año 2010, registrando una progresión en los niveles de cumplimiento del 92.5% en el año 2010 hasta del 78.3% en el año 2013; siendo el 100% en el caso que la emisión fuese igual al valor techo establecido. Aun así, existe un margen de mejora para poder incrementar el compromiso con el medio ambiente reduciendo la emisión de COVNM mediante el desarrollo de materias primas con un menor contenido en disolventes y de sistemas de control. En este último caso, el desarrollo de nuevas tecnologías biológicas para el control de las emisiones de los COVNM en los sectores en los que todavía no son aplicables, proporcionan una alternativa a las tecnologías utilizadas en la actualidad más rentable económicamente, más sostenible medioambientalmente y mejor aceptada socialmente.

1.1 TECNOLOGÍAS ACTUALES PARA EL CONTROL DE LAS EMISIONES DE COV

Los métodos de control en los que se basan las tecnologías actuales para el control de las emisiones industriales de COV, que se encuentran recogidas en el documento de referencia de las MTD, se pueden clasificar en técnicas de recuperación y en métodos de eliminación. A su vez, estas tecnologías pueden ser de naturaleza física, como adsorción, absorción y condensación; química, como la incineración o la fotocatalisis; y biológica, como la biofiltración, entre otros.

La selección de la técnica más adecuada para el control de las emisiones de COV de origen industrial debe realizarse atendiendo a factores como la eficacia requerida, los costes del tratamiento y los impactos ambientales. Para la aplicación de una manera eficaz, económica y medioambientalmente viable de estas tecnologías para cada una de las aplicaciones industriales, la selección de alternativas se realiza en función del caudal y de la concentración de COV en la corriente a depurar, el rendimiento global de la operación y los límites de emisión. También han de tenerse en cuenta los parámetros económicos como la inversión inicial y los costes de operación.

Un parámetro de operación fundamental que afecta a los costes de las técnicas de control de las emisiones de COV es el caudal de la corriente a tratar. Una de las mayores ventajas que presentan los sistemas biológicos de control de emisiones industriales de COV son los menores costes de inmovilizado y de operación a elevados caudales. Generalmente, la tecnología de biofiltración es adecuada para emisiones con un caudal entre 1000 y 50000 m³ h⁻¹ y una concentración de hasta 1 g m⁻³ (Dragt, 1992; Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

Los tratamientos biológicos también presentan la ventaja de ser mucho más respetuosos con el medio ambiente que otros sistemas convencionales de control de COV como la incineración o la adsorción (Delhoménie y Heitz, 2005; Shareefdeen *et al.*, 2005), debido al menor consumo energético y a la ausencia de generación de residuos peligrosos, además de permitir la posibilidad de degradación de un amplio número de compuestos y la facilidad de operación y mantenimiento, entre otras (Khan y Ghoshal, 2000; Kumar *et al.*, 2011). Las tecnologías biológicas también presentan una serie de desventajas como la imposibilidad de recuperar el contaminante del aire o que la descomposición de los contaminantes es lenta en comparación con otras tecnologías por ser llevada a cabo por microorganismos (Khan y Ghoshal, 2000).

Todas estas ventajas hacen que los tratamientos biológicos se postulen como la mejor técnica disponible para un gran número de sectores industriales desplazando así a otras tecnologías, como la incineración, para el tratamiento de olores, compuestos orgánicos volátiles o contaminantes peligrosos en emisiones caracterizadas por bajas concentraciones de contaminante y elevados caudales (Deshusses, 1997). Dentro de estos sectores se encuentra la industria flexográfica, con emisiones típicas caracterizadas por caudales comprendidos entre 2000 y 5000 m³ h⁻¹ y concentraciones de COV que varían entre 0.5 y 2 g m⁻³ por máquina de impresión (Sempere, 2010). En la industria flexográfica se utilizan diferentes tipos de tintas: en base disolvente, en base agua y de secado por ultravioletas. Dentro de las tintas en base disolvente, que históricamente han sido las más populares por su elevada velocidad de secado, se pueden distinguir tres tipos de disolventes, los disolventes verdaderos (alcoholes como etanol o isopropanol), diluyentes (acetatos como acetato de etilo) y los retardantes (1-metoxi-2-propanol). La biodegradación de estos compuestos es compleja, por lo que existe un creciente interés en el estudio de las cinéticas de degradación de los COV utilizados en la industria (Datta y Philip, 2012). La biodegradabilidad aerobia de los disolventes utilizados en la industria flexográfica ha sido demostrada en varios trabajos realizados con biofiltros percoladores a escala de laboratorio con compuestos puros como el isopropanol (San-Valero *et al.*, 2013), con una mezcla 1:1:1 en masa de etanol, acetato de etilo y metil etil cetona (Sempere *et al.*, 2008) y a escala industrial (Sempere *et al.*, 2011).

Principalmente, las tecnologías biológicas utilizadas para el control de emisiones de COV son procesos aerobios de biofiltración son biolavadores, biofiltros, biofiltros percoladores y bioreactores de membrana. Entre éstos, las tres primeras técnicas se hallan recogidas en el documento sobre mejores técnicas disponibles (European Commission, 2014). En estos sistemas los contaminantes

del aire son degradados a compuestos menos peligrosos, como agua y CO₂, cuando el aire contaminado pasa a través de un medio biológico activo que se encuentra adherido con una biopelícula a un sustrato orgánico o inorgánico. Los sistemas biológicos convencionales presentan una serie de inconvenientes como la baja eficacia de eliminación en el tratamiento de emisiones con elevada concentración de contaminante, la obstrucción por el crecimiento excesivo de biomasa, elevada superficie necesaria para su construcción, sobretodo en el caso de los biofiltros, y que el tiempo de vida media del material de relleno es limitado en caso de utilizar material biológico (Delhoménie y Heitz, 2005).

A continuación se describen los cuatro sistemas existentes en la actualidad para la eliminación biológica de COV.

- Biolavadores

El sistema de biolavador consiste en el paso de una corriente de gas contaminada por una torre de contacto, donde los contaminantes son absorbidos por la fase líquida y transferida al licor mezcla de un tanque de aireación donde se produce la regeneración de la fase líquida. El gas contaminado y la fase líquida se aplican en contracorriente en la torre de absorción, que puede contener material de relleno inerte para aumentar la superficie específica entre el COV y la fase líquida (van Groenestijn y Hesselink, 1993). La fase líquida contaminada es conducida a un reactor biológico aireado y agitado. Este reactor biológico contiene los microorganismos en suspensión necesarios para la degradación biológica de los COV y la solución de nutrientes esencial para su crecimiento y mantenimiento. Esta configuración de reactor biológico requiere un menor espacio que otros procesos biológicos, permite el tratamiento de caudales elevados que presenten fluctuaciones y proporciona una elevada estabilidad del proceso, un mejor control de los diferentes parámetros y una menor pérdida de presión (Berenjian *et al.*, 2012). Las principales desventajas que presenta esta tecnología es que sólo se pueden tratar compuestos solubles, se genera un residuo líquido, se precisa de la generación de biomasa para la degradación de los contaminantes en el líquido y es complejo de operar y mantener (Kumar *et al.*, 2011).

- Biofiltros

La biofiltración consiste en que una corriente húmeda de gas contaminado pase a través de un lecho de relleno poroso, donde una población microbiana mixta, capaz de degradar los COV a dióxido de carbono y agua, se encuentra inmovilizada. Generalmente, los contaminantes que se encuentran en la corriente gaseosa se transfieren de la fase gas a los microorganismos. Es necesario un nivel mínimo de humedad para que los microorganismos mantengan su actividad. Este tipo de tecnología es de construcción sencilla y presenta menores costes de inmovilizado y de operación que las técnicas físico-químicas tradicionales. Las principales desventajas de este tipo de tratamiento se encuentran relacionadas con la complejidad inherente del proceso biológico, como es mantener una humedad constante, además que puede causar la obstrucción por crecimiento excesivo de la biomasa.

- Biofiltros percoladores

En este sistema el gas contaminado pasa a través de un material de relleno inerte, que se encuentra bajo un riego semicontinuo con una fase acuosa de una solución nutritiva. El material de relleno, sobre el que se encuentran inmovilizados los microorganismos, posee una elevada superficie específica y puede ser estructurado o desordenado. El material utilizado normalmente en el relleno de los biofiltros percoladores es plástico. Durante el riego, los COV contenidos en el gas son transferidos a la fase líquida, difundándose a la biopelícula donde son degradados.

En este sistema, al contrario que en los biofiltros, no se requiere un control de la humedad del aire de entrada, ya que se satura durante el riego del sistema.

- Bioreactor de membrana

Los bioreactores de membrana se presentan como una alternativa emergente a los tratamientos biológicos convencionales utilizados para el tratamiento de aire contaminado. En este tipo de reactor biológico, los microorganismos no tienen contacto directo con la corriente de gas contaminada, ya que los contaminantes se transfieren a la biopelícula a través de una membrana. Esta tecnología permite el paso selectivo de los contaminantes a través de la membrana. Una de las principales ventajas que presenta esta tecnología es que no permite el contacto directo de la

biomasa en el caso que produzcan concentraciones tóxicas para los microorganismos de algún compuesto.

1.2 TRATAMIENTO ANAEROBIO DE LECHO GRANULAR

Existe la posibilidad de realizar el tratamiento anaerobio de las emisiones de COV una vez éstos se encuentren transferidos a la fase líquida. En esta sección se realiza una revisión bibliográfica de la degradación anaerobia y de su aplicación para la degradación de disolventes.

1.2.1 Etapas del proceso microbiológico y bioquímico

La degradación anaerobia es un proceso en el que la materia orgánica es degradada por diferentes comunidades de microorganismos en ausencia de oxígeno y nitrato, para la obtención como producto final gas con un elevado contenido energético. Este proceso consta de un conjunto de transformaciones bioquímicas que se producen en serie o en paralelo. Primero, los compuestos poliméricos son hidrolizados a monómeros solubles por enzimas extracelulares. Estos monómeros son fermentados u oxidados anaeróbicamente a ácidos de cadena corta, alcoholes, dióxido de carbono, hidrógeno y amoníaco. Los ácidos de cadena corta, diferentes al ácido acético, son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Finalmente, se produce la metanogénesis por la fermentación del acetato a metano y dióxido de carbono (metanogénesis acetoclástica) y por la reducción del dióxido de carbono (dador de electrones) por el hidrógeno (aceptor de electrones), resultando la producción de metano (metanogénesis hidrogenotrófica). Estas reacciones se pueden agrupar, según el producto final obtenido, en las etapas de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

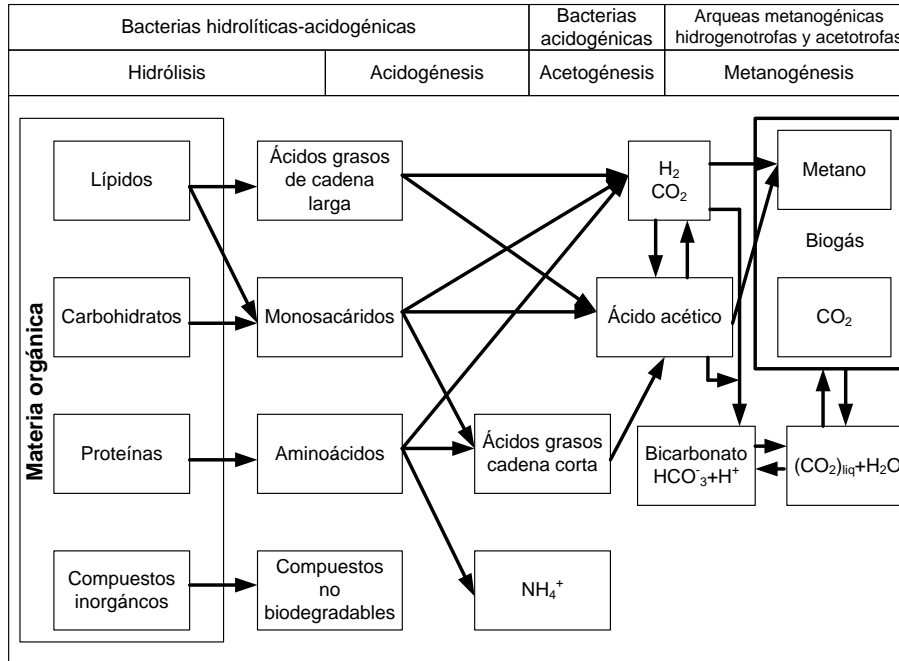


Figura 1.1 Esquema de la degradación anaerobia (adaptado de Flotats *et al.*, 2011)

Etapa de hidrólisis

La etapa de hidrólisis es la primera en el proceso de degradación anaerobia y consiste en la desintegración e hidrólisis de compuestos orgánicos complejos, como lípidos, proteínas y carbohidratos, a compuestos solubles, como azúcares, ácidos grasos de cadena larga, aminoácidos y alcoholes, que pueden atravesar la membrana celular. Estas reacciones son llevadas a cabo por enzimas extracelulares (exoenzimas), como proteasas, lipasas y celulasas, excretadas por las bacterias acidogénicas en un proceso de varias etapas, entre las que se comprende: producción de las enzimas, difusión en el medio, adsorción, reacción y desactivación. Una vez realizada la hidrólisis, estas bacterias toman el producto resultante como sustrato. Generalmente, la etapa de hidrólisis se considera el paso limitante de la degradación anaerobia de sustratos complejos (Miron *et al.*, 2000), no por la ausencia de las exoenzimas, sino por la disponibilidad y la estructura del sustrato. Esto hace que, en algunos casos, sea necesario el pretratamiento del residuo para disminuir el tamaño de partícula, lo que provoca un aumento de la superficie de adsorción de las enzimas hidrolíticas.

La velocidad de hidrólisis se ve afectada por, entre otros parámetros, el pH (Chen *et al.*, 2007), la temperatura (Mahmoud *et al.*, 2004), el tiempo de retención

celular, tipo y naturaleza del sustrato particulado (Pavlostathis y Giraldo-Gomez, 1991) y la inhibición por parte de los productos generados en las etapas de hidrólisis y acidogénica (Lettinga, 1995b).

Etapa acidogénica

En la etapa acidogénica, los compuestos solubles obtenidos en la anterior etapa son convertidos, por parte de las bacterias acidogénicas, en compuestos más simples de bajo peso molecular como ácidos grasos de cadena corta (ácidos grasos volátiles), esto es, ácido acético, propiónico y butírico, principalmente. También se pueden obtener como subproducto de esta etapa alcoholes, amonio, dióxido de carbono e hidrógeno, dependiendo de las condiciones de la degradación, el producto de la hidrólisis que se degrada y la actividad de los microorganismos. La acidogénesis es un proceso catabólico de oxidación incompleta en el que los compuestos orgánicos sirven como dadores y aceptores de electrones y en el que el adenosin trifosfato (ATP) se produce por fosforilación a nivel de sustrato, por lo que se define como un proceso fermentativo. Según esta definición, la acidogénesis únicamente se contempla en la fermentación de azúcares y aminoácidos, y no de ácidos grasos de cadena larga provenientes de la hidrólisis de lípidos.

Durante la etapa de acidogénesis, los azúcares son fermentados a ácidos liberando electrones. Los electrones liberados se pueden eliminar mediante dos mecanismos diferentes: usando los productos de sus propias reacciones como aceptores de electrones, como por ejemplo el etanol, o convirtiendo los protones a hidrógeno molecular mediante enzimas hidrogenasa. En este último caso, el producto final de la fermentación es el acetato en lugar del conjunto de etanol, propionato, lactato o butirato, que realizan la función de aceptores de electrones. Además, la eliminación del hidrógeno molecular por parte de las bacterias metanogénicas, desnitrificantes y sulfatorreductoras permite a las bacterias acidogénicas la producción de subproductos más oxidados que, consecuentemente, proporcionan mayores cantidades de ATP para estas bacterias. En el caso de la producción de hidrógeno, en la práctica, en un reactor anaerobio de una sola fase, únicamente se encuentra presente acetato debido a que el hidrógeno producido es consumido de manera eficaz por los microorganismos metanogénicos.

Los aminoácidos, que son los componentes esenciales de las proteínas, se pueden fermentar mediante dos rutas principales:

Una de las rutas se basa en que existen microorganismos que obtienen su energía mediante la reacción redox entre pares de aminoácidos. El ejemplo más generalizado de esta ruta es la reacción Stickland, debido a que la fermentación de la mitad de los aminoácidos se realiza mediante esta reacción (Grady *et al.*, 2011). Durante esta reacción un aminoácido es oxidado a un ácido volátil con un átomo de carbono menos que el aminoácido original, y el aminoácido receptor de electrones es reducido hasta un ácido volátil con el mismo número de átomos de carbono que el aminoácido original. Esta reacción es la forma más simple de fermentar los aminoácidos y proporcionar al microorganismo aproximadamente 0.5 mol ATP por mol de aminoácido transformado (Andreesen *et al.*, 1989). Los aminoácidos que son oxidados son: alanina, leucina, isoleucina, vanila e histidina, mientras que los que son reducidos son: glicina, prolina, hidroxiprolina, triptófano y arginina; aunque existen ciertos aminoácidos, como la lisina, que pueden actuar como dadores y receptores de electrones. Los productos de la oxidación de Stickland son siempre NH_3 , CO_2 y ácido carboxílico con un átomo menos que el aminoácido que fuera oxidado. Un aspecto importante de la degradación de los aminoácidos es la formación de NH_3 , el cual puede afectar a la capacidad tamponadora del sistema, además de ser un nutriente esencial, aunque a elevadas concentraciones causa la inhibición del proceso.

Los microorganismos que no llevan a cabo la reacción de Stickland, realizan la fermentación de los aminoácidos en un proceso que requiere la presencia de las bacterias que utilizan hidrógeno (Ramsay y Pullammanappallil, 2001). La reacción que se lleva a cabo depende del microorganismo que va a realizar la fermentación y del aminoácido que va a ser fermentado. En un medio con un cultivo de microorganismos mixto y con la presencia de diferentes aminoácidos, la degradación de aminoácidos, vía una ruta diferente a la reacción Stickland, sólo tiene lugar si existe escasez de aminoácidos que pueden actuar como aceptores de electrones. Para proteínas como caseína, albúmina y gelatina, esta circunstancia se da en menos de un 10% del total de los aminoácidos fermentados (Nagase y Matsuo, 1982); con lo que la vía en la que se produce la reacción Stickland es la preferencial para la fermentación de las proteínas.

Etapa acetogénica

En la etapa acetogénica los productos intermedios generados en la etapa acidogénica son oxidados por las bacterias acetogénicas a ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, que son los sustratos adecuados para los microorganismos implicados en la etapa metanogénica. Las reacciones que se llevan a cabo en la etapa acetogénica afectan tanto a los ácidos grasos de cadena larga producidos en

la fermentación de los lípidos, como a los ácidos grasos de cadena corta producidos en la fermentación de los azúcares y aminoácidos. Esta etapa puede desarrollarse a partir de dos rutas diferentes: deshidrogenación acetogénica e hidrogenación acetogénica.

La ruta de la deshidrogenación acetogénica consiste en la formación de ácido acético e hidrógeno molecular utilizando como sustrato ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos de cadena corta y alcoholes. La oxidación anaerobia de estos compuestos se lleva a cabo mediante el proceso denominado β -oxidación. Este proceso consiste en la ruptura de los ácidos grasos para generar acetil-CoA, ATP y las formas reducidas de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FADH₂). Para que tenga lugar este proceso es necesario la activación del ácido graso mediante coenzima A, dando lugar a un tioéster, lo que reduce la toxicidad del ácido graso. En la activación también se produce la fosforilación para la formación de ATP. Tras la activación, se producen dos reacciones de deshidrogenación independientes. En la primera, se transfieren electrones a FAD²⁺, mientras que en la segunda, se transfieren a NAD⁺. Al final del proceso se produce la escisión de los carbonos α y β del ácido graso, dando lugar, a acetil-CoA, formado a partir del carbono α y del carbono carboxílico, y acil-CoA, formado por la coenzima A y un ácido graso dos átomos de carbono más corto que el original. El acil-CoA vuelve a entrar en la secuencia de reacciones descrita.

Desde el punto de vista termodinámico, las reacciones que se llevan a cabo durante la deshidrogenación acetogénica no pueden ocurrir de forma espontánea, ya que en condiciones normales (T=298.15 K, P=1 atm) la energía libre de Gibbs (ΔG) asociada a la oxidación de los ácidos grasos es positiva. Sin embargo, a bajas presiones de hidrógeno, entre 10⁻⁴ y 10⁻⁵ atm, la energía libre de Gibbs se vuelve negativa, lo que propicia la oxidación de NADH y FADH₂ necesaria para que se lleve a cabo el proceso de β -oxidación. Bajo condiciones anaerobias de baja presión de hidrógeno, los hidrones pueden actuar como aceptores finales de electrones cedidos por el sustrato oxidado, dando lugar a hidrógeno molecular. Mediante esta reacción se consigue una elevada cantidad de hidrógeno gas, ya que la mayoría de los electrones, sobre un 70%, presentes en los sustratos oxidados anaeróbicamente forman H₂ (Grady *et al.*, 2011).

En los sistemas anaerobios es necesaria la presencia de los microorganismos hidrogenotrofos para mantener baja la presión parcial de hidrógeno y poder llevar a cabo la deshidrogenación acetogénica, formando estos microorganismos una asociación sintrófica con microorganismos acetogénicos obligados productores de hidrógeno. La necesidad de la proximidad de estos

microorganismos para llevar a cabo la sintrofia puede ser el motivo por el cual el crecimiento en suspensión de los microorganismos anaerobios se produce, normalmente, de una forma densa y en gránulos en lugar de una forma dispersa (Zhu *et al.*, 1997).

La hidrogenación acetogénica u homoacetogénesis consiste en la formación de ácido acético usando como único sustrato H_2 y CO_2 . La reducción del CO_2 y la producción de ácido acético es llevada a cabo por los organismos homoacetogénicos a través de la vía del acetyl-CoA o vía de Ljungdahl-Wood. Esta vía se compone de dos vías lineales, una en la que una molécula de CO_2 es reducida al grupo metilo del acetato y otra, en la que es reducido al grupo carbonilo. El producto de estas dos vías se ensambla para formar acetyl-CoA.

Etapa metanogénica

La etapa metanogénica es la última en el proceso de degradación anaerobia de un sustrato. Esta etapa consiste en la producción de metano a partir de un número limitado de sustratos, como ácido acético, hidrógeno, dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas y monóxido de carbono. Según la afinidad al sustrato de los microorganismos metanogénicos la metanogénesis se puede realizar mediante dos procesos diferentes: metanogénesis hidrogenotrófica y metanogénesis acetotrófica.

La metanogénesis hidrogenotrófica consiste en la reducción de CO_2 a CH_4 , oxidando H_2 . A parte de H_2 , los electrones necesarios para la reducción de CO_2 pueden ser aportados por el formiato, el monóxido de carbono e incluso algunos compuestos orgánicos como los alcoholes. Un caso concreto es la utilización de isopropanol, que es oxidado a acetona, produciendo los electrones necesarios para que se lleve a cabo la metanogénesis (Madigan *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 1980). El proceso de metanogénesis llevada a cabo por los microorganismos hidrogenotrofos se puede dividir en cuatro pasos:

1. Activación del CO_2 por la enzima que contiene metanofurano, reduciéndose a formilo.
2. El grupo formilo se transfiere a una enzima que contiene metanopterina, para ser deshidratado y reducido y formar metileno y metilo.
3. El grupo metilo se transfiere de la metanopterina a una enzima que contiene CoM.

4. El metil-CoM que se obtiene en el paso anterior es reducido por el sistema de metilreductasa. En esta reducción, se forma el complejo Ni^{2+} - CH_3 , tras ser eliminado el metil del grupo metil-CoM. El complejo formado es reducido por los electrones del CoB y un complejo de disulfuro de CoM y CoB ($\text{CoM-S}_2\text{-CoB}$), formando metano. Las coenzimas libre son regeneradas por la reducción de H_2 .

En condiciones estándar, el cambio de energía libre de Gibbs en la reducción del CO_2 a CH_4 con H_2 es de -131 kJ mol^{-1} , lo que es suficiente para la síntesis de una molécula de ATP.

En la metanogénesis acetotrófica se utiliza ácido acético y compuestos metilados para la formación de metano. Cuando el sustrato utilizado es ácido acético, éste es activado a acetil-CoA, que puede interactuar con la monóxido de carbono deshidrogenasa en la vía del acetil-CoA. En este momento, se produce CH_3 -corrinoide mediante la transferencia del grupo metilo del acetato a la enzima corrinoide. Tras este paso, el complejo CH_3 -corrinoide cede el grupo metilo a la CoM, dando lugar a CH_3 -CoM. A partir de éste se produce la formación de metano de la misma forma que en el paso 4 de la reducción de CO_2 , descrita anteriormente. En el caso de utilizar los compuestos metilados como sustrato, éstos son catabolizados pasando grupos metilo a una proteína corrinoide para formar CH_3 -corrinoide, y de allí cambia al paso terminal de la metanogénesis en el que interviene la CoM.

Para la formación de metano a partir de compuestos con grupos metilo, es necesaria la reducción del grupo metilo por parte de una fuente externa de electrones. Como fuente externa de electrones puede actuar el H_2 ($\Delta G = -113 \text{ kJ mol}^{-1}$), aunque en ausencia de éste, el grupo metilo se puede oxidar hasta CO_2 ($\Delta G = -319 \text{ kJ mol}^{-1}$) para generar los electrones necesarios para reducir otras moléculas con grupo metilo a metano. Esta última opción precisa de un aporte energético que se obtiene por la fuerza motriz del Na^+ generado por el potencial de membrana cargado de Na^+ . De este modo, en este tipo de organismos metanogénicos se encuentran dos tipos de bombas de iones, la bomba de protones utilizada para la síntesis de ATP y la bomba de Na^+ reversible que impulsa la oxidación del grupo metilo.

Sólo algunos de los microorganismos metanogénicos son acetotrofos, pero aproximadamente dos tercios del metano generado en la metanogénesis se produce utilizando como sustrato ácido acético (Grady *et al.*, 2011; Madigan *et al.*, 2004).

1.2.2 Microbiología de los tratamientos anaerobios

La descomposición anaerobia de la materia orgánica requiere de la interacción cooperativa de una gran variedad de microorganismos diferentes (Zinder, 1984). La distinción entre los diferentes grupos de microorganismos que intervienen en la degradación anaerobia se realiza atendiendo a los criterios de tipo de sustrato utilizado y producto final. Según este criterio, se pueden diferenciar tres grandes grupos: organismos hidrolíticos-acidogénicos, organismos acetogénicos y organismos metanogénicos.

Organismos hidrolíticos-acidogénicos

Los organismos hidrolíticos-acidogénicos comúnmente encontrados en digestores anaerobios incluyen los grupos taxonómicos *Clostridia*, *Bacilli*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (Elías *et al.*, 2012; Krause *et al.*, 2008). En bacterias que realizan la fermentación de aminoácidos vía la reacción de Stickland tienen un rendimiento de $0.06 \text{ g DQO}_{\text{biomasa}} \text{ g DQO}^{-1} \text{ aminoácido consumido}$ (Grady *et al.*, 2011). En el caso de las reacciones diferentes a la Stickland, las bacterias que llevan a cabo la fermentación de los aminoácidos pertenecen a dos grandes grupos: bacilos formadores de esporas y cocos anaerobios (Nagase y Matsuo, 1982). Estas bacterias poseen un mayor rendimiento que las que realizan la fermentación de los aminoácidos, entre 0.1 y $0.17 \text{ g DQO}_{\text{biomasa}} \text{ g DQO}^{-1} \text{ carbohidrato consumido}$ (Grady *et al.*, 2011), y pueden sobrevivir en condiciones ambientales extremas como bajo pH, elevada carga orgánica (Amani *et al.*, 2010) y elevada temperatura (Ahring *et al.*, 2001).

Organismos acetogénicos

Los organismos acetogénicos se pueden dividir a su vez según el sustrato que utilizan para su metabolismo entre los que consumen ácidos grasos (deshidrogenación acetogénica) o los que consumen hidrógeno y dióxido de carbono (hidrogenación acetogénica).

Los organismos que utilizan los ácidos grasos como sustrato requieren una baja presión parcial de hidrógeno ($<10^{-4}$ atm) para mantener unas condiciones termodinámicas favorables y así realizar la conversión de los ácidos grasos a ácido acético. Este requerimiento se obtiene mediante la asociación sintrófica con microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos. Esta asociación tiene una serie de características específicas:

- Ninguno de los microorganismos asociados son capaces de eliminar los ácidos grasos por sí solos, aunque la degradación de este sustrato se encuentre relacionado con el crecimiento.

- La distancia entre las células de los microorganismos asociados afecta al rendimiento del proceso y a la velocidad de crecimiento de los microorganismos implicados, por lo que forman agregados, siendo ésta una de las razones de la formación de fangos anaerobios granulares.
- Aunque la energía libre asociada a las conversiones de los ácidos grasos es positiva, la relación sintrófica se encuentra cerca del equilibrio termodinámico, por lo que son necesarios mecanismos bioquímicos especiales para la distribución de la energía química entre los individuos y la comunidad.

Los órdenes más comunes de los organismos que realizan la deshidrogenación acetogénica son: *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Clostridium* (Kallistova *et al.*, 2014) y *Acetobacterium* (Balch *et al.*, 1977).

La identificación bacteriana mediante secuenciación del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S ha mostrado que la mayoría de los microorganismos que son capaces de llevar a cabo un metabolismo sintrófico pertenecen a la clase *Deltaproteobacteria* y las bacterias gram positivas de bajo contenido en G+C (Kallistova *et al.*, 2014; McInerney *et al.*, 2008). Los géneros que se incluyen dentro de *Deltaproteobacteria* son *Syntrophus*, *Syntrophobacter*, *Desulfoglaeba*, *Geobacter*, *Desulfovibrio* y *Pelobacter*. Uno de los dos grupos de microorganismos que realizan el metabolismo sintrófico, pertenecientes a las bacterias gram positivas de bajo contenido en G+C se compone por los géneros *Desulfotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Sporotomaculum*, y *Syntrophobotulus*. El segundo grupo de bacterias gram positivas de bajo contenido en G+C se encuentra formado por la familia *Syntrophomonadaceae*, que comprende los géneros *Syntrophomonas*, *Syntrophothermus* y *Thermosyntropha* (McInerney *et al.*, 2008).

Según Grady *et al.* (2011), el rendimiento de los organismos que llevan a cabo la deshidrogenación acetogénica depende del sustrato utilizado, siendo entre 0.04 y 0.05 g DQO_{biomasa} g DQO⁻¹_{consumido} cuando el sustrato utilizado es ácido propiónico, 0.06 g DQO_{biomasa} g DQO⁻¹_{consumido} cuando el sustrato es ácido valérico o ácido butírico y entre 0.04 y 0.045 g DQO_{biomasa} g DQO⁻¹_{consumido} si el sustrato utilizado son ácidos grasos de cadena larga.

Los microorganismos que realizan la hidrogenación acetogénica reciben el nombre de bacterias homoacetogénicas. Estas bacterias son autotróficas, ya que utilizan como único sustrato para la producción de ácido acético, H₂ y CO₂. Las bacterias típicas que realizan este tipo de metabolismo pertenecen a los géneros *Acetobacterium* y *Clostridium* (Weiland, 2010).

Organismos metanogénicos

La metanogénesis es llevada a cabo predominantemente por microorganismos del dominio *Archaea* (Jones *et al.*, 1987; Postgate, 1969). Los microorganismos metanogénicos se caracterizan por presentar células procariotas con diversos compuestos que forman paredes celulares, como la pseudomureína, metanocondroitina o las glicoproteínas de pared, que provocan que estas bacterias sean resistentes a los antibióticos que afectan al resto de microorganismos procariotas (Lettinga, 1995b).

Según el sustrato utilizado, se puede diferenciar entre metanogénicas acetotrofas, que utilizan como sustrato ácido acético, o metanogénicas hidrogenotrofas, que utilizan como sustrato H_2 y CO_2 .

A pesar que la mayor parte de la producción de metano producido se realiza utilizando ácido acético como sustrato, sólo dos géneros utilizan este compuesto como sustrato: *Methanosaeta* y *Methanosarcina*. Ambos géneros se encuentran en el orden de *Methanomicrobiales* (Jones *et al.*, 1987) con otros grupos de metanógenas metilotrofas como *Methanococcoides* y *Methanobolus*.

Methanosaeta tiene forma de bacilo y a veces crece en forma de filamentos. El crecimiento de las especies de este género es lento, con un tiempo necesario para doblar el número de células que oscila entre 3.5 y 9 días a 35 °C (Zinder, 1984). Por otro lado, *Methanosarcina* se presenta en forma de cocoides que crecen agrupados. El crecimiento de este género es más rápido que el de *Methanosaeta*, observándose un tiempo necesario para doblar el número de células entre 1 y 2 días a 35 °C (Zinder, 1984). Estos dos géneros de acetotróficas poseen diferentes estrategias de crecimiento. *Methanosarcina* es generalista, siendo capaz de crecer con varios sustratos además de ácido acético, como metanol, monóxido de carbono, metilaminas o H_2 y CO_2 . Sin embargo, *Methanosaeta* es un especialista que sólo es capaz de crecer en presencia de ácido acético. Este último género se ve favorecido por la presencia de bajas concentraciones de ácido acético, debido a su elevada afinidad por el sustrato, k_s de 0.7 mM (Huser *et al.*, 1982), por lo que para obtener un mayor crecimiento en un reactor anaerobio es necesario elevar el tiempo de retención de sólidos. *Methanosarcina*, en cambio, posee una afinidad por el sustrato menor, k_s de 3 mM (Schonheit *et al.*, 1982). El rendimiento por unidad de sustrato de estos microorganismos se encuentra entre 0.03 y 0.07 g DQO_{biomasa} g DQO⁻¹_{ácido acético} (Grady *et al.*, 2011)

Los microorganismos metanogénicos hidrogenotrofos producen aproximadamente un 30% del metano total generado en un reactor anaerobio en condiciones normales de operación (Lettinga, 1995b). Este grupo de organismos son capaces de crecer utilizando como sustrato H_2 , aunque gran parte de éstos pueden crecer también utilizando como sustrato ácido fórmico (Madigan *et al.*, 2004). Los géneros más comunes de este grupo de microorganismos son *Methanobacterium*, *Methanospirillum* (Leclerc *et al.*, 2004) y *Methanoculleus* (Hori *et al.*, 2006). El rendimiento de las metanogénicas hidrogenotrofas es muy bajo, mostrando que la producción de metano no contribuye significativamente a la formación de nueva biomasa, siendo el rendimiento entre 0.01 y 0.06 g DQO_{biomasa} g DQO⁻¹_{H₂ consumido} (Grady *et al.*, 2011).

1.2.3 Influencia de los parámetros ambientales y de control

Es bien conocido que los procesos anaerobios presentan ventajas frente a los aerobios tales como bajos costes de operación, producción de un subproducto de elevado interés energético como es el metano, menor espacio requerido, menor volumen de fango producido y los microorganismos anaerobios pueden permanecer largos periodos de tiempo (mayor a un año) sin adición de sustrato sin observar un deterioro en la actividad o la sedimentabilidad del fango (Lettinga, 1995a). En cualquier caso, se trata de procesos de mayor complejidad biológica, por lo que para la optimización de los tratamientos anaerobios es necesario conocer los numerosos factores existentes, tanto ambientales como operacionales, que influyen en el proceso, afectando al desarrollo y mantenimiento de una población microbiana adecuada. A continuación se describen los principales factores de operación que influyen en el funcionamiento de los reactores anaerobios.

1.2.3.1 Efecto de los parámetros ambientales

Efecto de la temperatura

El conocimiento de la dependencia de las constantes de velocidad de reacción biológica con la temperatura es muy importante para asegurar la eficacia conjunta de un proceso de tratamiento biológico (Tchobanoglous *et al.*, 2003). La temperatura afecta a la velocidad con la que se producen las reacciones de catálisis enzimáticas y a la difusión del sustrato en las células. Este último se produce por los cambios en las propiedades físicas y químicas del agua residual, afectando considerablemente al diseño y operación del sistema de tratamiento (Lettinga *et al.*, 2001). La relación de la temperatura con la velocidad de

crecimiento se muestra en la Figura 1.2. Esta figura muestra que la velocidad de crecimiento aumenta gradualmente con la temperatura hasta alcanzar un valor óptimo. Cuando se sobrepasa el valor óptimo de temperatura, la velocidad de crecimiento desciende rápidamente.

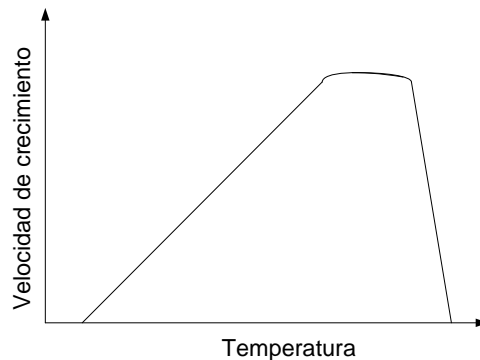


Figura 1.2- Efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de los microorganismos (adaptado de Bitton, 2011).

Los microorganismos están agrupados en tres categorías dependiendo del rango de temperatura en el que la velocidad de crecimiento alcanza su valor máximo. Los diferentes grupos en los que se agrupan los microorganismos y los intervalos de temperatura son:

- **Psicrofílico:** en este intervalo la biomasa se desarrolla a temperaturas comprendidas entre los 0 y los 20 °C, siendo el óptimo sobre los 15 °C.
- **Mesofílico:** este es el intervalo de temperatura más utilizado para la depuración de aguas residuales. En este intervalo, la biomasa anaerobia se desarrolla a temperaturas comprendidas entre 20 y 42 °C, siendo el óptimo de temperatura entre 32 y 38 °C (Kashyap *et al.*, 2003).
- **Termofílico:** en este intervalo la biomasa se desarrolla a temperaturas comprendidas entre los 42 y 75 °C, siendo el óptimo entre 50 y 55 °C (Kashyap *et al.*, 2003). Presentan una tasa de crecimiento alta.

El efecto de la temperatura en las dos primeras etapas de la digestión anaerobia (hidrólisis y acidogénesis) no es significativo debido a que en una población microbiana mixta siempre hay bacterias cuya temperatura óptima para alcanzar la mayor velocidad de crecimiento se encuentra en el intervalo de la temperatura de operación, además que presentan una elevada actividad en comparación con los microorganismos presentes en las otras etapas. Por contra,

las etapas de acetogénesis y metanogénesis son llevadas a cabo por microorganismos especializados, con lo que son más sensibles a los cambios de temperatura, además que su cinética de crecimiento es más lenta que las hidrolíticas y las acidogénicas. A pesar de esto, las bacterias anaerobias poseen una buena capacidad para adaptarse a los cambios de temperatura, siempre que no se exceda el límite de temperatura previamente definido en el que la tasa de muerte es mayor que el crecimiento neto (Rajeshwari *et al.*, 2000).

Los tratamientos anaerobios a temperatura ambiente (<18 °C) se consideran adecuados para el tratamiento de una gran variedad de aguas residuales (Enright *et al.*, 2005), especialmente en zonas de clima templado (del Pozo *et al.*, 2002). Por otro lado, a bajas temperaturas, se produce un descenso en la actividad metabólica y, en consecuencia, de la velocidad de crecimiento de los microorganismos, siendo más significativo el efecto negativo de la temperatura en la actividad metabólica de las comunidades de *Archaea* y de *Bacteria* que la presencia de compuestos de baja biodegradabilidad (Siggins *et al.*, 2011). La operación a baja temperatura afecta particularmente a los microorganismos acetogénicos y metanogénicos especializados, resultando en un aumento de la concentración de los ácidos grasos volátiles, que puede, a su vez, ocasionar la inhibición de la etapa metanogénica (Rajeshwari *et al.*, 2000). A pesar de esto, la tasa de crecimiento neto de la biomasa de las bacterias metanogénicas y acetogénicas se incrementa cuando desciende la temperatura (Lettinga *et al.*, 2001) debido a que la velocidad de muerte a temperaturas por debajo de 15 °C es muy baja. Kashyap *et al.* (2003) y Kettunen y Rintala (1997) observaron que la degradación anaerobia en condiciones psicrófilas era llevada a cabo por bacterias mesófilas que toleran las bajas temperaturas, por lo que si se realiza una aclimatación previa de los microorganismos a la temperatura de operación del reactor anaerobio se logran mayores eficacias de eliminación.

Efecto del pH

Las reacciones biológicas anaerobias son muy dependientes del pH. Cada grupo de microorganismos anaerobio tiene un intervalo de pH óptimo diferente. Las bacterias productoras de ácidos toleran bajos pH y tienen un óptimo a pH entre 5 y 6, mientras que las bacterias productoras de metano tienen un funcionamiento óptimo en un intervalo de pH entre 6.7 y 7.4, siendo la variación del pH un factor más inhibitorio para los microorganismos productores de metano que para los acidogénicos.

La operación de un reactor anaerobio dentro del intervalo óptimo de pH de los microorganismos metanogénicos frente al de los acidogénicos previene la

predominancia de estos últimos, evitando la acumulación de ácidos grasos volátiles. Cuando en el reactor se alcanzan valores de pH menores de 6 o mayores de 8, la actividad de los organismos productores de metano comienza a disminuir, originando un desequilibrio entre la producción y consumo de ácidos grasos volátiles. Este desequilibrio produce la acumulación de ácidos grasos volátiles, lo que contribuye al descenso del pH y da lugar a un proceso autoinducido de acidificación del reactor. La acidificación del reactor produce serios problemas de operación (Liu y Tay, 2004). En condiciones normales de operación, el descenso en los valores de pH causado por los microorganismos acidogénicos se regula con el bicarbonato producido por los microorganismos productores de metano (Bitton, 2011), aunque bajo condiciones ambientales adversas la capacidad reguladora del pH del sistema puede fallar. La concentración de alcalinidad necesaria para asegurar un pH neutro depende del contenido de CO₂ en la fase gas, que se encuentra en equilibrio con la cantidad de CO₂ disuelto. Para una concentración de este compuesto entre un 30 y un 50% es necesario mantener una concentración de alcalinidad comprendida entre 2000 y 4000 mg CaCO₃ l⁻¹ (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Un método para reestablecer el balance de pH es incrementar la alcalinidad mediante la adición de compuestos como cal, amoníaco, sosa o bicarbonato sódico, siendo este último el más indicado por la seguridad en el manejo, su fácil disolución en agua y que su sobredosis no afecta al proceso de digestión anaerobia (Lettinga, 1995b).

Efecto del aporte de nutrientes

La presencia de iones en el agua residual a tratar es esencial para que tenga lugar el crecimiento y la actividad de la población microbiana. Sin embargo, en ausencia de crecimiento todavía es posible obtener una sustancial degradación de los contaminantes (Lettinga, 1995a). La necesidad de los diferentes nutrientes por parte de los microorganismos depende de su proporción en la composición celular. Según esta composición, se puede establecer una distinción entre los elementos con mayor presencia en la composición de las bacterias, macronutrientes, y los que tienen menor presencia, micronutrientes.

En el caso de los micronutrientes, las bacterias formadoras de metano tienen una relativa elevada concentración de hierro, níquel y cobalto en su composición elemental, tal y como muestra la Tabla 1.1. Aparte de los elementos descritos en esta tabla, para el desarrollo de una población microbiana heterogénea, es necesario que en el agua residual se encuentren ciertos elementos en concentraciones traza como son extracto de levadura, ya que contiene vitamina B₁₂, cofactor de enzimas implicadas en la metanogénesis del

metanol, acetato y presumiblemente metilaminas (Jones *et al.*, 1987), o los metales aluminio o boro.

Tabla 1.1 Composición elemental típica de bacterias metanogénicas en base seca (adaptado de Lettinga, 1995b).

Macronutrientes		Micronutrientes	
Elemento	Concentración, g kg ⁻¹	Elemento	Concentración, mg kg ⁻¹
Nitrógeno	65	Hierro	1800
Fósforo	15	Níquel	100
Potasio	10	Cobalto	75
Azufre	10	Molibdeno	60
Calcio	4	Cinc	60
Magnesio	3	Manganeso	20
		Cobre	10

En cuanto a la necesidad de los principales macronutrientes, basándose en las necesidades de nutrientes derivadas de la composición celular, Lettinga (1995) recomienda una relación DQO:N:P de 1000:5:1 y una relación C:N:P de 330:5:1 para un reactor en el que se produce la degradación de ácidos grasos volátiles y otros compuestos con un rendimiento de crecimiento aproximado de 0.05 g g⁻¹.

Muchos tipos de aguas residuales contienen nutrientes suficientes para asegurar el crecimiento de los microorganismos, como es el caso del agua residual proveniente de cerveceras. En caso contrario, si se utiliza un agua residual sintética, hay que adicionar nutrientes al agua residual a depurar para asegurar una buena capacidad de tratamiento del reactor.

Efecto de la producción de biogás

La producción de biogás influye sobre la agitación dentro del reactor anaerobio y, en consecuencia, sobre formación de los gránulos y sus características. El tratamiento de elevadas cargas orgánicas provocan, consecuentemente, una mayor producción de biogás, generando una mayor agitación dentro del reactor (Seghezzi *et al.*, 1998). Esta turbulencia natural causada por la corriente influente y la producción de biogás en el reactor proporcionan una mayor superficie de contacto de la biomasa (Heertjes y Meer, 1978).

Por otra parte, la velocidad superficial generada por el biogás producido tiene una elevada influencia en la formación de los gránulos. La granulación se encuentra desfavorecida por una excesiva producción de biogás, por lo que una

elevada producción de biogás generada durante el tratamiento de elevadas cargas orgánicas causa el desprendimiento de la biomasa de la superficie del gránulo y su erosión (Syutsubo *et al.*, 1997).

1.2.3.2 Efecto de los parámetros de control

Efecto de la carga orgánica

La carga orgánica (CO) es la cantidad de materia orgánica introducida en un reactor diariamente por unidad de volumen. Este es uno de los parámetros de control más importantes debido a que afecta significativamente a la ecología microbiana (Sakar *et al.*, 2009).

La sensibilidad a la introducción de una excesiva carga orgánica depende del tipo de reactor utilizado. Los reactores de lecho granular expandido o fluidizado (RALF) soportan mejor las sobrecargas producidas por la operación con una elevada carga orgánica que los reactores en cultivo en suspensión. En estos reactores, cuando se produce una sobrecarga puntual se reestablecen rápidamente las condiciones normales de operación. Aunque, por otro lado, los reactores con lecho granular son muy sensibles a la sobrecarga de materia orgánica durante el proceso de la puesta en marcha, efecto sobre la granulación asociado al proceso biológico o relacionado con la producción de biogás que se indica anteriormente, produciéndose la pérdida de la biomasa durante el proceso de granulación.

Efecto del tiempo de retención hidráulico y de la velocidad superficial

El tiempo de retención hidráulico se define como el tiempo medio que permanece el agua residual en el interior del sistema de tratamiento, mientras que la velocidad superficial es la velocidad a la que se desplaza el líquido en un punto dado de la superficie. Ambos términos se encuentran inversamente relacionados para una misma sección de un reactor anaerobio.

Varios estudios han demostrado que la granulación de la biomasa anaerobia se lleva a cabo a relativamente elevadas velocidades superficiales, demostrando que no es posible el desarrollo de los gránulos si no se producen unas condiciones de estrés físico selectivo provocado por la hidrodinámica del reactor (Alves *et al.*, 1998; Arcand *et al.*, 1994; O'Flaherty *et al.*, 1997). Por tanto, la granulación de la biomasa anaerobia se verá favorecida por tiempos de retención hidráulicos cortos y velocidades superficiales elevadas, debido a que se produce el lavado en el reactor de las bacterias que no son capaces de estimular la formación de gránulos. En el caso de que se empleen tiempos de residencia

hidráulica largos, acompañados de bajas velocidades superficiales, se favorece el crecimiento disperso de bacterias, lo que es desfavorable para el fomento de la granulación de la biomasa (Liu y Tay, 2004).

A parte de favorecer la formación de gránulos, el incremento en la velocidad superficial también mejora el índice volumétrico de la biomasa anaerobia. Este hecho fue constatado por Noyola y Moreno (1994) en un reactor anaerobio de manto de lodo con flujo ascendente (RAFA), ya que observaron que el incremento de la velocidad de sedimentación con el aumento de la velocidad superficial de forma progresiva de 1 a 50 m h⁻¹.

Efecto de la variación del caudal del agua residual

Los reactores anaerobios se encuentran expuestos a variaciones del caudal del agua residual a tratar debido, en el caso del tratamiento de aguas residuales urbanas, a los cambios en las actividades humanas, y el caso del tratamiento de aguas industriales, ligados a las condiciones de producción. Estas variaciones pueden afectar de forma adversa a la eficacia de la degradación anaerobia (van Lier *et al.*, 2001). El efecto de las variaciones de caudal sobre el rendimiento del sistema depende del tiempo de retención hidráulico aplicado, tiempo de retención de sólidos, la intensidad y duración de las variaciones, las propiedades de la biomasa y el diseño del reactor anaerobio, en particular del diseño del separador de tres fases (Leitão *et al.*, 2006).

La situación de estrés provocada por las variaciones repentinas de caudal puede causar el desequilibrio termodinámico del sistema. Este desequilibrio produce la acumulación de ácidos grasos volátiles debido a que se descompensa la relación entre microorganismos productores y consumidores de ácidos grasos volátiles. También se puede producir un cambio en la presión parcial de hidrógeno, llegando a valores por encima de 10⁻⁴ atm, por la descompensación entre productores y consumidores de hidrógeno, produciéndose elevadas cantidades de hidrógeno y dióxido de carbono. Esto puede acarrear la inhibición de la degradación de ácido propiónico, ácido butírico y ácido láctico (Cánovas-Díaz y Howell, 1988; Cohen *et al.*, 1982; Eng *et al.*, 1986; Fongastitkul *et al.*, 1994). Otro efecto de la situación de estrés producido por la variación de caudal es el cambio en la producción y composición de biogás (Chua *et al.*, 1997).

1.2.4 Proceso de granulación en reactores anaerobios de lecho granular

La granulación del fango anaerobio ha permitido el desarrollo de la tecnología para el tratamiento de aguas residuales utilizando elevadas cargas

orgánicas. Una de las ventajas que posee el fango anaerobio granulado es la elevada velocidad de sedimentación, proporcionando la oportunidad de trabajar con bajos tiempos de residencia hidráulica y elevados tiempos de retención de sólidos. La otra ventaja que ofrece el fango granular es una elevada actividad metanogénica específica, ligada a la proximidad de las bacterias acetogénicas y las microcolonias de las arqueas metanogénicas hidrogenotrofas, permitiendo que la transferencia de hidrógeno entre ambos tipos de microorganismos sea más eficiente.

Diversas teorías se han desarrollado para explicar la formación de gránulos por parte de la biomasa anaerobia. Atendiendo al factor principal responsable de la formación de gránulos, se puede distinguir entre mecanismos físico-químicos, microbiológicos y termodinámicos (Tabla 1.2).

Los modelos físico-químicos se basan en que el proceso de granulación anaerobia comienza con la adhesión de los microorganismos o la autoinmovilización y puede ser definida dentro de los términos de la energía que existe en la interacción entre bacterias o de las bacterias con una superficie sólida (Liu *et al.*, 2003). En esta interacción intervienen fuerzas repulsivas, como fuerzas electroestáticas o la interacción de hidratación, y atractivas, como las fuerzas de van der Waals.

El modelo de núcleo inerte se basa en que los microorganismos anaerobios presentes en un reactor de lecho granular se adhieren a la superficie de micropartículas inertes, para formar una biopelícula inicial llamada gránulo embrionario. Los gránulos maduros se forman a partir del crecimiento de los microorganismos adheridos. Por otro lado, el modelo de presión de selección se asienta en que la biomasa que no posee la capacidad para estimular la formación de los gránulos anaerobios es lavada del interior del reactor por las fuerzas hidrodinámicas, permaneciendo en el interior del reactor anaerobio sólo la biomasa formadora de gránulos.

Según el modelo de unión de iones positivos multivalentes, la granulación de la biomasa anaerobia se puede estimular mediante la adición de iones positivos, como calcio, magnesio, aluminio o hierro. Estos iones, según este modelo, reducen la repulsión electroestática que producen las cargas negativas de la superficie que poseen las células a pH neutros, favoreciendo la autoinmovilización de los microorganismos. También se han utilizado con éxito la adición de polímeros, naturales o sintéticos, para la estimulación de la granulación, tal y como se postula en el modelo de unión mediante polímeros naturales y sintéticos. Algunos de los iones y polímeros estudiados en la bibliografía para la

estimulación de la granulación de biomasa anaerobia se muestran en la Tabla 1.3, indicando si fomentan la granulación y si afectan de forma positiva o negativa a la eficacia del proceso. Cabe destacar el caso de la adición de calcio que, en concentraciones menores a 300 mg l^{-1} favorece la granulación de la biomasa, pero la adición de concentraciones superiores produce el efecto contrario, además de tener un efecto negativo sobre la eficacia del proceso de degradación anaerobia (Boonsawang *et al.*, 2008).

Las teorías basadas en la microbiología explican la granulación por la acción de una serie de microorganismos que poseen unas características especiales. Las diferentes aproximaciones se agrupan en fisiológicas, crecimiento de un núcleo de microorganismos y ecológicas, tal y como muestra la Tabla 1.2.

La aproximación fisiológica considera que la producción de polímero extracelular por parte de los microorganismos bajo ciertas condiciones ambientales es el factor responsable de la formación de los gránulos. Esta aproximación se encuentra ligada a las condiciones físico-químicas del reactor (Hulshoff *et al.*, 2004), ya que para la formación del gránulo es necesario la selección por presión de microorganismos responsables de la granulación, así como la existencia de un núcleo formado por los sólidos del influente donde se produce la colonización por parte de los microorganismos.

La teoría de crecimiento de un núcleo de microorganismos se fundamenta en que la formación de los gránulos se realiza en dos fases, la primera en la que se forman los precursores, y la segunda en la que se produce el crecimiento de los gránulos a partir de estos precursores. En la primera fase de formación, que se considera la más crucial del proceso de formación del gránulo, es importante la presencia de arqueas filamentosas del género *Methanosaeta*. También pueden actuar como precursores arqueas del género *Methanosarcina*, debido a que este género genera de forma espontánea pequeños agregados al excretar polímeros extracelulares que permiten la adhesión de bacterias que crecen sintróficamente con estos microorganismos metanogénicos. A pesar de que el género *Methanosarcina* sea precursor de la formación de gránulos, la presencia de una elevada concentración de estas arqueas en un reactor anaerobio no es deseable, ya que pueden causar problemas operacionales (Wiegant y Man, 1986).

Tabla 1.2 Mecanismos y principales teorías del proceso de granulación de la biomasa anaerobia (adaptado de Hulshoff *et al.*, 2004).

Tipo de mecanismo	Teoría	Referencia
Físico-químico	Modelo de núcleo inerte	Lettinga <i>et al.</i> , 1980
	Modelo de presión de selección	Hulshoff <i>et al.</i> , 1983
	Modelo de unión de iones positivos multivalentes	Mahoney <i>et al.</i> , 1987
	Modelo de unión mediante polímeros naturales y sintéticos	Elmamouni <i>et al.</i> , 1998
Microbiológico	Fisiológicas	Sam-soon <i>et al.</i> , 1987
	Crecimiento de un núcleo de microorganismos	Chen y Lun, 1994
	Ecológicas	Ahn, 2000; Macleod <i>et al.</i> , 1990; Morgan <i>et al.</i> , 1991; Wu y Jain, 1996
Termodinámico	Formación de un núcleo cristalizado	Zhu <i>et al.</i> , 1997
	Modelo de tensión superficial	Thaveesri <i>et al.</i> , 1995
	Translocación de protones-deshidratación	Tay <i>et al.</i> , 2000

La presencia del género *Methanosaeta* para la formación del gránulo es fundamental en la aproximación ecológica. Según esta aproximación, la granulación comienza por la adhesión de colonias de cocos y bacilos de bacterias acidogénicas y acetogénicas sobre *Methanosaeta*, formando microflóculos con un tamaño comprendido entre 10 y 50 μm . Luego, debido a la morfología filamentosa de *Methanosaeta*, se establecen “puentes” entre los microflóculos formados pudiendo constituir gránulos de tamaño mayor a 200 μm . Finalmente, el crecimiento del gránulo se realiza por el desarrollo de las bacterias acidogénicas y acetogénicas.

Las teorías termodinámicas se centran en el análisis de los mecanismos de granulación en términos de la energía que interviene entre las paredes celulares o entre la pared celular y otra superficie en el proceso de adhesión de microorganismos por causas físico-químicas. Otros aspectos que también se tienen en cuenta son la hidrofobicidad, la movilidad electroforética y la influencia de la actividad de translocación de protones realizada a través de la membrana celular, la cual produce energía.

Zhu *et al.* (1997) desarrollaron la teoría de formación de un núcleo cristalizado basada en que las bacterias acidogénicas y acetogénicas se asocian con arqueas metanogénicas formando pequeños agregados. Estos agregados se yuxtaponen formando gránulos. La estructura y composición del gránulo propuesta por esta teoría se contraponen con la desarrollada por MacLeod *et al.* (1990), que sugiere que *Methanosaeta* ocuparía el núcleo del gránulo, las bacterias acetogénicas formadoras de hidrógeno se encontrarían alrededor del núcleo y que, en la parte externa del gránulo se encontrarían las bacterias acidogénicas y los microorganismos consumidores de hidrógeno.

El modelo de tensión superficial relaciona la adhesión de las bacterias involucradas en el consorcio anaerobio en reactores de lecho granular con la termodinámica de la superficie de la célula. Las bacterias sólo pueden obtener la máxima energía libre de adhesión (ΔG_{adh}) cuando la tensión superficial del líquido en la superficie es elevada o baja. Con elevada tensión superficial se ve favorecida la adhesión de bacterias con baja energía en la superficie o bacterias hidrofóbicas, mientras que, con baja tensión superficial se ve favorecida la formación de agregados de bacterias hidrofílicas. Se estableció una tercera zona incluida dentro de los valores de tensión superficial comprendidos entre 50 y 55 mNewton (N) m^{-1} , en la que no se favorece la formación de agregados ni de bacterias hidrofílicas ni hidrofóbicas debido al bajo potencial de adhesión. Según esta teoría, los gránulos formados en condiciones de baja tensión superficial, con bacterias acidogénicas como una fase sólida en asociación con los microorganismos metanogénicos, resulta en una operación del reactor más estable, debido a que los agregados formados son menos susceptibles de permitir la adhesión de biogás que conlleva el lavado de la biomasa de un reactor anaerobio.

Tabla 1.3 Revisión bibliográfica de cationes y polímeros, naturales y sintéticos, utilizados para estimular la formación de gránulos anaerobios

Cationes utilizados para el estímulo de la granulación			
Catión	Autores	Favorece la granulación	Efecto sobre la eficacia del proceso
Ca ²⁺	Mahoney <i>et al.</i> , 1987	Sí	n.d.
	Teo <i>et al.</i> , 2000	Sí	n.d.
	Yu <i>et al.</i> , 2001	Sí	Negativo
	Ghangrekar <i>et al.</i> , 2005	Sí	n.d.
	Boonsawang <i>et al.</i> , 2008	Sí/No	n.d./Negativo
Mg ²⁺	Schmidt y Ahring, 1993	Sí	Positivo
Fe ²⁺	Yu <i>et al.</i> , 2000	Sí	Negativo
	Vlyssides <i>et al.</i> , 2009	Sí	Positivo
	Zhang <i>et al.</i> , 2011	Sí	Positivo
Na ⁺	Ghangrekar <i>et al.</i> , 2005	No	n.d.
	Li <i>et al.</i> , 2014	Sí	n.d.
Al ³⁺	Yu <i>et al.</i> , 2001	Sí	n.d.
	Boonsawang <i>et al.</i> , 2008	Sí	n.d.
	Abbasi <i>et al.</i> , 2013	Sí	n.d.
Polímeros utilizados para el estímulo de la granulación			
Polímero	Autores	Favorece la granulación	Efecto sobre la eficacia del proceso
Chitosan	Elmamouni <i>et al.</i> , 1998	Sí	n.d.
	Nuntakumjorn <i>et al.</i> , 2008	Sí	Positivo
	Phalakornkule y Khemkhao, 2010	Sí	Positivo
Poliacrilamida	She <i>et al.</i> , 2012	Sí	n.d.
AA 184 H	Show <i>et al.</i> , 2004	Sí	Positivo
DADMAC	Bhunja y Ghangrekar, 2008	No	Negativo
Kymene SLX-2	Uyanik <i>et al.</i> , 2002	Sí	Positivo
MEM 8265	Hudayah <i>et al.</i> , 2012	Sí	n.d.

n.d. no detectado

Tay *et al.* (2000) propusieron una teoría para explicar el mecanismo molecular que se lleva a cabo durante la formación de los gránulos de biomasa anaerobia. Esta teoría se basa en la actividad de translocación de protones de la

membrana celular en bacterias. En esta teoría se considera que el proceso de granulación se produce en cuatro pasos: deshidratación de la superficie de las bacterias, la formación del embrión granular, la maduración del gránulo y la post-maduración.

En condiciones normales, la superficie de las células de las bacterias tienen carga negativa, facilitando los puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, resultando la célula cubierta por una red de moléculas de agua. A pesar de esto, la repulsión producida por la hidratación de las células no interfiere en la formación de agregados celulares. Por ello, en esta teoría se argumenta que las bacterias acidogénicas, durante la acidificación de sustratos, bombea protones desde el citoplasma al exterior de la célula. La translocación de los protones produce la energía necesaria para poder romper los puentes de hidrógeno y producir la deshidratación en la superficie celular, produciéndose la neutralización parcial de las cargas en la superficie celular necesaria para formar agregados. Tras esta primera etapa, se forman los gránulos embrionarios mediante la adhesión de bacterias acidogénicas, acetogénicas y arqueas metanogénicas, que irán creciendo durante la etapa de maduración del gránulo. En la etapa de post-maduración, la actividad de translocación de protones mantiene la superficie bacteriana en condiciones hidrofóbicas, siendo este mecanismo el máximo responsable del mantenimiento de la estructura granular.

1.2.5 Reactores anaerobios de lecho granular

Las primeras observaciones de la granulación de las biomásas anaerobias fueron descritas por Young y McCarty (1969) en un sistema de filtración anaerobia. Desde este momento, numerosos autores desarrollaron diferentes sistemas de alta carga utilizando como base el lecho anaerobio granular para la degradación de diversos tipos de aguas residuales debido a las ventajas que ofrece esta tecnología, como bajo requerimiento energético para la operación, baja inversión inicial, poco espacio requerido para su construcción y la baja producción de sólidos (Liu y Tay, 2004).

A finales de los años 70, en los Países Bajos, se desarrolló el reactor anaerobio de manto de lodo con flujo ascendente (RAFA), más conocido por sus siglas en inglés UASB (*up flow anaerobic sludge blanket*). Más tarde se desarrollaron modificaciones, como el reactor anaerobio continuo de tanque agitado (RCTA) operado con biomasa granular, el reactor de circulación interna (CI), reactor de lecho expandido (RALF), reactor anaerobio discontinuo de tanque agitado o reactor anaerobio de manto migracional (RAMM). También se han

combinado estos reactores con otros procesos para tratar diversos tipos de aguas residuales. La biomasa anaerobia granular aplicada a los reactores anaerobios de alta carga se ha convertido en una opción económica para el tratamiento de aguas residuales, de tal forma que las principales empresas que proveen esta tecnología venden más reactores de alta carga tipo circulación interna o de lecho expandido que otros más convencionales como los reactores anaerobios de manto de lodo con flujo ascendente (van Lier, 2008). A continuación se describen brevemente estos tipos de reactores.

Reactor anaerobio de manto de lodo con flujo ascendente (RAFA)

Los reactores RAFA consisten en un separador gas-líquido-sólido, que permite retener la biomasa en el interior del reactor mediante la separación de ésta del efluente, un sistema de distribución del influente en la zona baja del reactor y una zona para verter el efluente en la parte superior. Las velocidades superficiales típicas en este tipo de reactores se encuentran entre 0.5 y 5 m h⁻¹, y el ratio entre la altura y el ancho del reactor es entre 0.2 y 0.5. Los reactores RAFA se diseñan para el tratamiento de cargas orgánicas entre 10 y 15 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (Lim y Kim, 2014). El primer reactor RAFA fue utilizado para el tratamiento de las aguas residuales provenientes de una refinería de azúcar de remolacha en los Países Bajos. Más tarde, se ha demostrado la capacidad de este tipo de reactor para el tratamiento de agua residual de otro tipo de industrias como destilerías, plantas de procesado de alimentos, curtido y agua residual municipal (Rajeshwari *et al.*, 2000).

Reactor anaerobio continuo de tanque agitado (RCTA)

En este tipo de reactores, que se caracterizan por una agitación mecánica para asegurar la mezcla completa dentro del reactor, se ha observado la formación de gránulos de biomasa anaerobia. Las fuerzas hidrodinámicas producidas por la agitación tienen un papel crucial para mantener la integridad del gránulo (Liu y Tay, 2004). Este tipo de reactor se puede utilizar para el tratamiento de bajas cargas orgánicas, entre 0.25 y 3 kg DQO m⁻³ d⁻¹, y elevados tiempos de residencia hidráulicos, entre 10 y 60 días (Saleh y Mahmood, 2004).

Reactor de circulación interna (CI)

El reactor de circulación interna (CI), o en inglés *internal circulation reactor* (IC), consiste en la interconexión de dos compartimentos RAFA, uno encima del otro, y se caracteriza por la separación del biogás en dos etapas dentro del reactor. El influente se introduce por la parte baja del reactor, utilizando un sistema de distribución eficaz para favorecer su mezcla con la biomasa anaerobia granular del

interior. En el compartimento inferior se produce la mayor parte de la conversión de la materia orgánica a metano y dióxido de carbono. Este biogás es recogido en el separador ubicado al final del primer compartimento, generando el ascenso del biogás, forzando al agua a ascender por la conducción de ascensión hasta el separador gas-líquido situado en la parte superior del reactor. El biogás es extraído del sistema a través del separador y el agua vuelve al fondo del reactor a través de la conducción de descenso. En el segundo compartimento se separa el efluente del biogás y es conducido al exterior por la parte superior del reactor. Este diseño permite la operación del reactor anaerobio con elevadas velocidades superficiales de líquido y gas, con lo que es factible tanto el tratamiento de aguas residuales con baja carga orgánica, así como de aguas residuales con elevada carga orgánica.

Este tipo de reactor se ha probado con éxito en la depuración de diversos tipos de efluentes de origen industrial en la industria láctea, en cerveceras, en centros de procesado de patatas y otro tipo de industrias del sector de la alimentación, con cargas orgánicas comprendidas entre 10 y 40 kg DQO m⁻³ d⁻¹ y velocidades superficiales de hasta 10 m h⁻¹ (Driessen y Yspeert, 1999).

Reactor anaerobio de lecho expandido o fluidizado (RALE)

Los reactores de lecho expandido o fluidizado, o por sus siglas en inglés EGSB (*expanded granular sludge bed*), son una extensión del proceso que se lleva a cabo en los reactores RAFA donde el lecho de lodo granular es expandido mediante el uso de un reactor más estrecho y una velocidad superficial más elevada (Grady *et al.*, 2011), normalmente superior a 6 m h⁻¹. La elevada velocidad superficial contribuye a la separación de la biomasa suspendida de los gránulos maduros, con la consecuente pérdida de los microorganismos que no se encuentran adheridos a estos gránulos. La configuración del reactor, con una relación alto-acho entre 4 y 5, aumenta la producción de biogás por unidad de área (Zoutberg y Debeen, 1997) debido al aumento de la mezcla hidráulica, causando un mayor contacto entre la biomasa y el agua residual a tratar.

El mayor contacto entre la biomasa y el agua residual provocado por la expansión del lecho proporciona a este tipo de reactores la capacidad de tratar compuestos poco biodegradables (Zoutberg y Debeen, 1997), el tratamiento con elevadas cargas orgánicas (Seghezzo *et al.*, 1998), superiores a 30 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (Lim y Kim, 2014), y el tratamiento de aguas residuales con una elevada viscosidad provocada por bajas temperaturas. Además, la dilución del influente producida por la recirculación del efluente permite el tratamiento de compuestos tóxicos. Las características de esta tecnología la hacen adecuada para el tratamiento tanto de

aguas residuales de origen industrial como de origen urbano (Lettinga *et al.*, 2001; Zoutberg y Debeen, 1997).

Reactor anaerobio discontinuo de tanque agitado (RDTA)

El funcionamiento de un reactor discontinuo de tanque agitado se divide en cuatro fases: fase de llenado, fase de reacción, fase de sedimentación y fase de vaciado. La mezcla durante la operación del reactor en la fase de reacción se realiza mediante agitación mecánica. La capacidad de eliminación de este tipo de tecnología es similar a la alcanzada en los reactores de tipo RAFA cuando se operan en condiciones de baja carga orgánica (Kennedy y Lentz, 2000), siendo las cargas orgánicas típicas de tratamiento entre 0.5 y 3 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Las ventajas que ofrece este tipo de tratamiento sobre un tratamiento en continuo son: una elevada flexibilidad del proceso en términos de tiempo de ciclo y secuencias. Durante la fase de llenado la operación se asemeja a la operación en flujo de pistón, no se produce la sedimentación de la biomasa durante la operación, no es necesario el uso de un decantador externo y se evita que se produzcan cortocircuitos hidráulicos.

Reactor anaerobio de manto migracional (RAMM)

El reactor anaerobio de manto migracional, o por sus siglas en inglés AMBR (*anaerobic migrating bed reactor*) fue descrito por primera vez por Angenent y Sung (2001). Este reactor está compuesto por varios reactores conectados entre sí en serie, con agitación mecánica en continuo. El influente es bombeado al primero de los reactores y efluente es extraído por el último, de tal forma que la mayor producción de biogás se produce en los primeros reactores. Durante la operación de estos reactores se ha observado la migración de la biomasa, de forma que se acumula en el último reactor, provocando que este último compartimento haga la función de decantador para evitar que se pierda parte de la biomasa con el efluente. Con el objetivo de evitar la excesiva acumulación de biomasa en este último compartimento es necesario revertir el flujo del efluente periódicamente, de forma que el compartimento que hace la función de decantador pase a ser aquel en el que entra el influente. Esta configuración presenta una serie de ventajas como, por ejemplo, se evita que se produzcan cortocircuitos hidráulicos, presentan una elevada eficacia de eliminación de compuestos poco biodegradables (Liu y Tay, 2004) y es capaz de obtener elevadas eficacias de eliminación a temperaturas bajas (15 °C) (Angenent *et al.*, 2001). Por contra, la estructura interna de estos reactores es más compleja que la de los de tipo RAFA.

Una de las principales ventajas de los reactores basados en la granulación de la biomasa es la retención en el interior del reactor de los microorganismos adaptados a la degradación de compuestos lentamente biodegradables. El resto de ventajas e inconvenientes se recogen en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Ventajas e inconvenientes del uso de un reactor anaerobio de alta carga (Grady *et al.*, 2011; Rajeshwari *et al.*, 2000; van Lier, 2008).

Ventajas

Elevada concentración de fango y elevado tiempo retención de sólidos, con lo que se consigue una reducción del 90% del espacio requerido por un sistema aerobio.

Reactores de volumen pequeño por la capacidad de tratar elevadas cargas orgánicas, entre 20 y 35 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Con estos sistemas se alcanzan elevadas eficacias de eliminación, resultando una elevada calidad del efluente.

Mecánicamente sencillo.

Reducción en la producción de fango por encima del 90%.

No se usan carburantes fósiles para el tratamiento, ahorrando alrededor de 1 kWh kg⁻¹ DQO_{eliminada}.

Producción de energía térmica de 13.5 MJ kg⁻¹ DQO_{eliminada}, lo que supone una producción de energía eléctrica de 1.5 kWh (asumiendo el 40% de eficiencia en la conversión).

Rápida puesta en marcha (1 semana) si se utiliza fango granular como inóculo.

Inconvenientes

El tiempo requerido para la puesta en marcha del reactor es elevado debido a la necesidad de formación de un fango granular. La eficacia del sistema depende de la formación de gránulos densos con elevada sedimentabilidad.

Estos reactores se operan con tiempos de retención hidráulicos cortos, lo que supone una menor dilución de los inhibidores.

Se precisa de un experto para la operación y control de estos reactores.

1.2.6 Aplicación de los procesos anaerobios a la degradación de disolventes orgánicos

El uso de agua en los procesos industriales resulta en elevados volúmenes de agua residual con una elevada presencia de contaminantes orgánicos, principalmente en aquéllas provenientes de la industria farmacéutica, la cosmética, la textil o la del caucho. La degradación anaerobia de los compuestos orgánicos de estos efluentes industriales es muy compleja debido a que requiere la participación de una variedad de microorganismos que coexisten en una población mixta (Terzis, 1994).

Un gran número de autores han demostrado la capacidad de los reactores anaerobios de alta carga para el tratamiento de efluentes industriales que contienen productos tóxicos o recalcitrantes (Mchugh *et al.*, 2003). En concreto, los reactores de tipo RALF fueron los primeros en utilizarse a escala industrial para el tratamiento de un agua residual que contenía 10 g l^{-1} de formaldehído y 20 g l^{-1} de metanol con eficacias de eliminación del 99% (Zoutberg y Frankin, 1996). Los procesos anaerobios también se han mostrado eficaces para el tratamiento de otros disolventes como disolventes alifáticos (Henry *et al.*, 1996), alcoholes (Eichler y Schink, 1985; Widdel, 1986; Zellner y Winter, 1987), ésteres (Yanti *et al.*, 2014), éteres (Fincher y Payne, 1962), aldehídos (Todini y Pol, 1992) y cetonas (Taylor *et al.*, 1980; Tonouchi, 2004).

A continuación se presentan los mecanismos de degradación anaerobia de los disolventes de interés de esta tesis doctoral.

Degradación anaerobia de etanol

La degradación anaerobia de etanol se puede producir por varias vías diferentes dependiendo de la concentración de sulfato en el agua residual. Las reacciones acetogénicas, sulfurogénicas y metanogénicas involucradas en la degradación de etanol se muestran en la Tabla 1.5. En ausencia de sulfato, la mayor parte de la degradación anaerobia de etanol se produce por una relación sintrófica de una bacteria acetogénica y una arquea metanogénica (Bryant *et al.*, 1967). En la Figura 1.3 se indica la ruta metabólica llevada a cabo por los microorganismos acetogénico para la degradación de etanol hasta ácido acético. También fue observada la producción de metano por la degradación directa de etanol por parte de la cepa de arquea metanogénica CV (Widdel, 1986), aunque no ha sido observado con posterioridad (Zellner y Winter, 1987). En presencia de sulfato, el etanol es utilizado como sustrato por las bacterias sulfatorreductoras, obteniendo como producto final ácido sulfhídrico y energía (Tabla 1.5).

Tabla 1.5 Reacciones acetogénicas, sulfurogénicas y metanogénicas involucradas en la degradación anaerobia del etanol (adaptado a partir de Kalyuzhnyi *et al.* (1997) y Thauer *et al.* (1977))

Reacciones acetogénicas		
$C_2H_5OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	$\Delta G^0 = +9.6 \text{ kJ mol}^{-1}$	(1.1)
Reacciones sulfurogénicas		
$2C_2H_5OH + SO_4^{2-} \rightarrow 2CH_3COO^- + HS^- + H^+ + 2H_2O$	$\Delta G^0 = -66.4 \text{ kJ mol}^{-1}$	(1.2)
$CH_3COO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2HCO_3^- + HS^-$	$\Delta G^0 = -47.6 \text{ kJ mol}^{-1}$	(1.3)
$4H_2 + H^+ SO_4^{2-} \rightarrow HS^- + 4H_2O$	$\Delta G^0 = -38.1 \text{ kJ mol}^{-1}$	(1.4)
Reacciones metanogénicas		
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO^-$	$\Delta G^0 = -31 \text{ kJ mol}^{-1}$	(1.5)
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	$\Delta G^0 = -33.9 \text{ kJ mol}^{-1}$	(1.6)

La reacción de deshidrogenación acetogénica del etanol es endergónica (Tabla 1.5), por lo que es necesario el gasto de ATP para que sea llevada a cabo. Este hecho indica que parte de la energía que se obtiene de la ganancia de ATP en la fosforilación a nivel de sustrato obtenida en la formación de ácido acético (Figura 1.3) es utilizada en la formación de una fuerza protón motriz para la síntesis de nuevas moléculas de ATP.

Se ha observado entre las bacterias acetogénicas y arqueas hidrogenotrofas que participan en la sintrofia de la degradación de etanol que, para la obtención de una mayor cantidad de energía libre en el sistema, se invierte la mayor parte de la energía obtenida en la formación de la fuerza protón motriz. Schink (1997) determinó más concretamente que un tercio de una unidad de ATP generada por los microorganismos participantes en la sintrofia era utilizada para el crecimiento celular y dos tercios eran invertidos para la formación de la fuerza protón motriz, obteniendo en la reacción global de degradación de etanol a metano una energía libre de formación de -56 kJ mol^{-1} etanol. Este autor llegó a esta conclusión a partir de que Seitz *et al.* (1990) determinara en un co-cultivo de *Pelobacter acetylenicus* y *Methanobacterium bryantii*, que el rendimiento de crecimiento celular de la bacteria productora de hidrógeno era bajo, entre 1.7 y 2.2 g mol^{-1} etanol. Esta relación se mantuvo constante en varias asociaciones

sintróficas entre diferentes microorganismos, siendo el rendimiento de crecimiento celular de las bacterias acetogénicas inferior a la mitad (44-67%) del rendimiento total de crecimiento obtenido por la degradación anaerobia de etanol, que es entre 3.3 y 5 g mol⁻¹ etanol.

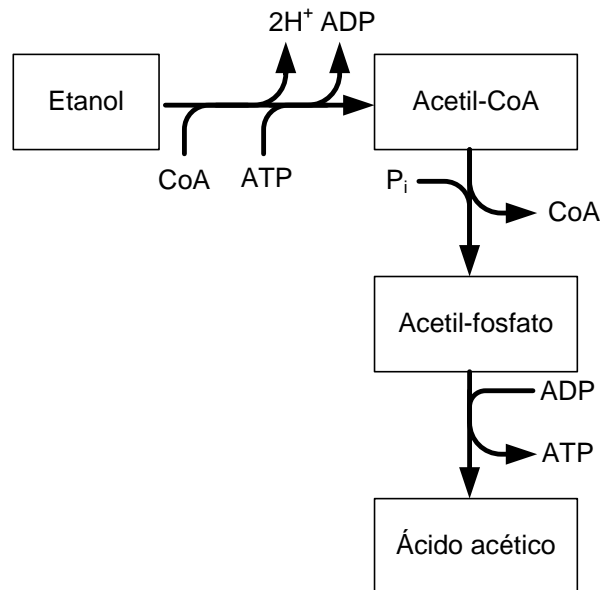


Figura 1.3.- Ruta metabólica de la degradación anaerobia de etanol (adaptado a partir de Dimroth y Hilpert, 1984).

Las bacterias encargadas de la deshidrogenación del etanol pertenecen a los filos *Firmicutes*, en un 60%, y *Bacteroidetes*, en un 30%, como se ha observado en la población microbiana de un reactor anaerobio que trataba aguas residuales provenientes de una destilería (Huang *et al.*, 2014). La asociación predominante de estas bacterias es con las arqueas de la familia *Methanosarcinae*. Dentro de esta familia destaca, en la simbiosis para la degradación de etanol, la presencia del género *Methanosaeta* (Han *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2014), que utiliza de forma mayoritaria la vía acetoclástica para su metabolismo (Supaphol *et al.*, 2011), con lo que se deduce que la mayor parte de la formación de metano en la degradación anaerobia de etanol se produce por la oxidación de ácido acético.

En un medio con elevada concentración de sulfato, las bacterias sulfatorreductoras presentan una mayor ventaja competitiva por lo que, unido con elevada afinidad de estas bacterias para el uso de etanol como sustrato en comparación con ácido acético, el etanol es degradado mayoritariamente por este

grupo de bacterias. La principal bacteria sulfatorreductora que utiliza el etanol como sustrato son las pertenecientes al género *Desulfobrivio* (Jing *et al.*, 2013).

La degradación anaerobia de etanol con reactores anaerobios de alta carga es una tecnología establecida para el tratamiento de aguas residuales de cerveceras. Han *et al.* (2005) obtuvo eficacias de eliminación superiores al 90% tratando, en un reactor de tipo RAFA, cargas orgánicas inferiores a 15.3 g DQO l⁻¹ d⁻¹ de una mezcla 90% etanol y 10% de propanol y butanol. Por otro lado, Kato *et al.* (1994) obtuvo eficacias de eliminación de 72.6% al operar un reactor RALF con una carga orgánica de 32.4 g DQO l⁻¹ d⁻¹ de etanol.

Degradación anaerobia de isopropanol

La degradación anaerobia de isopropanol se realiza mediante la deshidrogenación de la molécula de isopropanol a acetona (Figura 1.4). Esta deshidrogenación es llevada a cabo por arqueas metanogénicas hidrogenotrofas, que utilizan el H⁺ que se obtiene en esta reacción para la reducción de CO₂, excretando como producto final metano y en la que, según Widdel (1986), se obtienen entre 0.24 y 0.26 moles de metano por cada mol de isopropanol degradado. En presencia de elevadas concentraciones de hidrógeno se revierte el proceso de deshidrogenación del isopropanol, formando de nuevo isopropanol a partir de acetona (Tonouchi, 2004; Zellner y Winter, 1987).

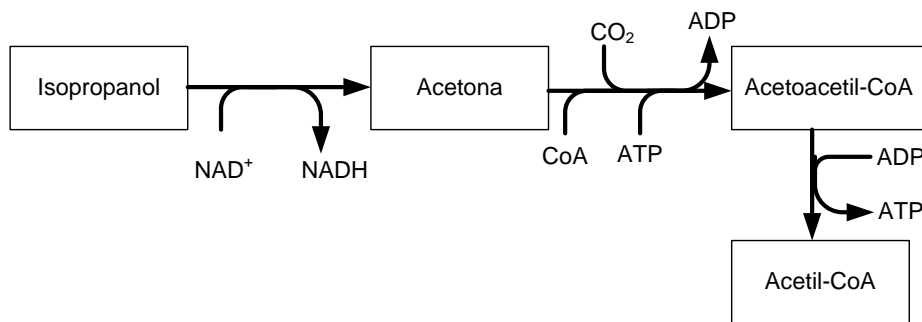


Figura 1.4.- Ruta metabólica de la degradación anaerobia de isopropanol y acetona a ácido acético (adaptado a partir de Platen *et al.*, 1994; Tonouchi, 2004).

Las arqueas metanogénicas pueden crecer en presencia de elevadas concentraciones de isopropanol. Widdel (1986) observó que la cepa SK podía crecer en presencia de 0.2 M de isopropanol y la cepa CV podía crecer a menor velocidad con concentraciones superiores a 0.5 M. Esta última cepa también

puede utilizar como sustrato etanol, no obstante el crecimiento en la fase exponencial es 4 veces más rápido en presencia de alcoholes secundarios, como el isopropanol, que en presencia de etanol, aunque utilizando como sustrato el alcohol primario se obtiene una mayor densidad celular.

En medios con isopropanol y en presencia de sulfato, la degradación del isopropanol es llevada a cabo por bacterias sulfatorreductoras debido a la ventaja competitiva de estas bacterias sobre las arqueas metanogénicas, que ha sido demostrada para otros sustratos como hidrógeno (Dar *et al.*, 2008; Oude Elferink *et al.*, 1994) y ácido acético (Colleran *et al.*, 1995; Oude Elferink *et al.*, 1994).

Los microorganismos del orden *Methanobacteriales* no utilizan el alcohol como sustrato, excepto *Methanobacterium formicum* y *Methanobacterium bryantii*. Tampoco se ha descrito el uso de isopropanol como sustrato en el orden *Methanococcales* y en varios géneros del orden *Methanomicrobiales*. Dentro del orden de *Methanomicrobiales*, se ha descrito el uso de isopropanol por parte de *Methanogenium marisnigri*, *Methanomicrobium paynteri*, *Methanocorpusculum parvum*, *Methanococcus chikugoensis* (Zellner y Winter, 1987) y *Methanococcus palmolei* (Tonouchi, 2004).

Para la completa degradación anaerobia del isopropanol a metano y dióxido de carbono es necesaria la intervención de arqueas metanogénicas que utilizan isopropanol como sustrato y la sintrofia de bacterias degradadoras de acetona, producto intermedio en la degradación del isopropanol, y arqueas metanogénicas acetotróficas. Esta degradación sintrófica se explica en el siguiente apartado. En ensayos en discontinuo se ha determinado un tiempo mínimo para la producción de metano a partir de isopropanol de 20 días (Tonouchi, 2004).

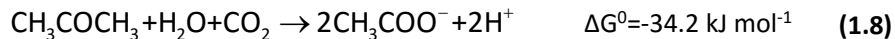
Degradación anaerobia de acetona

Como se ha mencionado anteriormente, en la degradación anaerobia de isopropanol se obtiene como producto intermedio acetona (Taylor *et al.*, 1980; Tonouchi, 2004) que, a su vez, tiene que ser transformada a metano y dióxido de carbono para completar la degradación anaerobia. Según Symons y Buswell (1932) la degradación de la acetona en condiciones anaerobias sigue la siguiente reacción general:



A partir de las observaciones realizadas de la degradación de acetona en un medio enriquecido con microorganismos metanogénicos, Platen y Schink (1987) determinaron que la degradación de acetona a dióxido de carbono y

metano es realizada por una bacteria acidogénica, que produce ácido acético utilizando como sustrato acetona. Esta bacteria acidogénica ha de formar un co-cultivo con una arquea metanogénica que utiliza como sustrato ácido acético para establecer una relación sintrófica entre ambas (reacción 1.8).



Los microorganismos acidogénicos realizan la carboxilación de la acetona a acetoacetil-CoA, que requiere el consumo de ATP ($\Delta G^0 = +17.1 \text{ kJ mol}^{-1}$), y luego lo transforman en acetil-CoA para obtener energía mediante la producción de una molécula de ATP vía fosforilación a nivel de sustrato (Figura 1.4). Sin embargo, todavía no se conoce si la carboxilación de la acetona se produce mediante un mecanismo que consume un tercio de la energía de una molécula de ATP, vía el transporte dependiente de iones carboxilasa, o por la vía análoga a la carboxilación del piruvato (vía fosfoenolpiruvato), que consume una molécula de ATP por molécula de acetona. De esta forma, si fuera por la primera de las vías habría una ganancia energética por parte de la bacteria, mientras que por la segunda, el consumo energético neto durante la carboxilación es cero.

Bajo condiciones estándar, el cambio en la energía libre de Gibbs asociada a la oxidación de la acetona es negativa, indicando que se trata de un proceso exergónico, termodinámicamente favorable. A pesar de esto, la energía liberada no es suficiente para la formación de 1 mol de ATP por fosforilación a nivel de sustrato, ya que se precisan entre 60 y 70 kJ mol^{-1} (Thauer *et al.*, 1977) para la carboxilación y la activación de las reacciones. Este hecho sugiere que la reacción inicial del metabolismo de la acetona se encuentra impulsada por el acoplamiento a la formación de una fuerza protón motriz y la síntesis de ATP, vía un gradiente de transmembrana a expensas de la concentración de H^+ o Na^+ (Janssen y Schink, 1995). Este metabolismo se encuentra relacionado con el anabolismo celular (Platen *et al.*, 1994).

La sintrofia de los microorganismos acidogénicos que degradan la acetona con arqueas metanogénicas que utilizan como sustrato ácido acético ha sido demostrada por la imposibilidad de obtener un cultivo puro de dichas bacterias acidogénicas y porque en cultivos en suspensión se ha observado que en presencia de concentraciones de ácido acético mayores a 10 mM se produce la inhibición de la fermentación de acetona (Platen *et al.*, 1994). Platen *et al.* (1994) observaron que la sintrofia de este microorganismo acidogénico es con arqueas del género *Methanosaeta*, que poseen la capacidad de ser precursores de la formación de

gránulos anaerobios y tienen entre 5 y 10 veces más afinidad por el ácido acético que las arqueas del género *Methanosarcina* (Jetten *et al.*, 1992; Zinder, 1990).

Schwartz (1991) realizó un ensayo en reactores anaerobios discontinuos con diferentes concentraciones de acetona (20, 200, 1000 y 2000 mg l⁻¹) con el fin de determinar la capacidad de los microorganismos anaerobios para degradar este compuesto y si la presencia de éste produce alguna toxicidad sobre dichos microorganismos. En concentraciones menores a 200 mg l⁻¹ no observaron toxicidad y la producción de biogás fue mayor a la medida en los reactores control. En presencia de concentraciones de acetona superiores a 1000 mg l⁻¹ se detectó un 10% menos de producción de biogás durante los dos primeros días, pero después de una semana se produjo una rápida degradación de acetona.

Degradación anaerobia de 1-metoxi-2-propanol

La degradación aerobia de 1-metoxi-2-propanol se encuentra bien documentada en la bibliografía, por el contrario la información sobre la degradación anaerobia de este compuesto es escasa. Únicamente existe un estudio previo a este trabajo de tesis doctoral llevado a cabo por Goodwin en 1998 (European Commission, 2006). El experimento de Goodwin consistió en la degradación en un reactor en discontinuo de una concentración de 1-metoxi-2-propanol de 50 mg carbono orgánico disuelto (COD) l⁻¹ durante 81 días a 34.8 °C, utilizando como inóculo biomasa proveniente de un digestor de una estación depuradora de aguas residuales urbanas. Se midió la producción de biogás los días 10, 17, 28, 42, 56, 70 y 80 tras la inoculación. Estos análisis revelaron un periodo de adaptación de aproximadamente 30 días para comenzar la biodegradación anaerobia de 1-metoxi-2-propanol. Al final del experimento se alcanzó la degradación del 38% del COD, no observándose la inhibición por toxicidad del 1-metoxi-2-propanol.

Los mecanismos de degradación anaerobia de 1-metoxi-2-propanol no se han determinado, aunque en la bibliografía se muestran varios mecanismos de degradación de los éteres glicólicos. En el caso del polietilenglicol (PEG), Schramm y Schink (1991) sugirieron que la enzima diol dehidratasa catalizaba la reacción para la ruptura del enlace éter y así formar acetaldehído como producto final. Esta enzima se encontró en el citoplasma de *Acetobacterium sp.* y *Pelobacter venetianus*. El acetaldehído formado es, probablemente, la fuente de carbono o energía de estos microorganismos (Kawai, 2002). En la ruptura del enlace éter del PEG para la formación de acetaldehído y PEG_{n-1} se requiere que el grupo terminal OH se desplace hasta la posición del segundo carbono mediante una reacción de mutasa, para formar un grupo hemiacetal inestable.

Por otro lado, Speranza *et al.* (2002) determinaron la ruta de degradación anaerobia de 2-fenoxietanol a fenol y acetaldehído realizado por *Acetobacterium sp.*, que conlleva la ruptura del enlace éter. Estos autores señalaron que la ruptura del enlace éter también se realizaba según la reacción catalizada por la diol dehidratasa, como la que se muestra en la Figura 1.5. Este proceso conlleva el doble intercambio entre H y OH para dar lugar a un grupo geminal diol que rápidamente colapsa a acetaldehído.

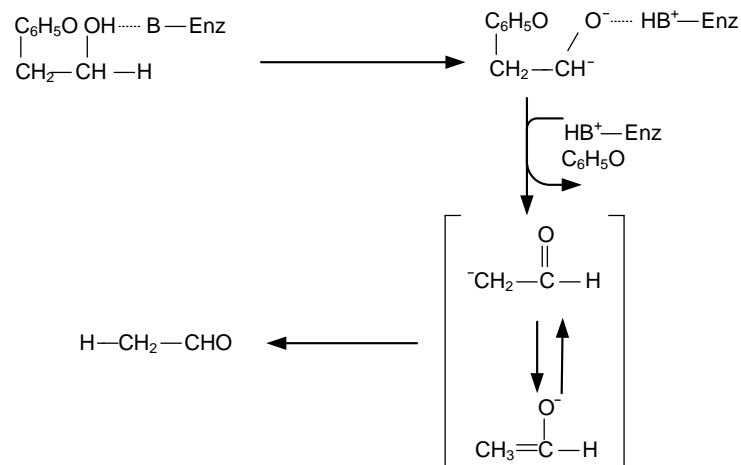


Figura 1.5.- Mecanismo de la enzima catalizadora de la ruptura del enlace C-O del 2-fenoxietanol realizada por el género *Acetobacterium* (adaptado de Speranza *et al.*, 2002).

Degradación anaerobia de acetato de etilo

La información sobre los mecanismos empleados por los microorganismos anaerobios para la degradación del acetato de etilo es escasa, sólo encontrando en la bibliografía aproximaciones a partir de estudios realizados con otros ésteres. La degradación anaerobia de este compuesto tiene lugar mediante reacciones llevadas a cabo por bacterias acetogénicas, formando como subproducto ácido acético, tal y como se colige del descenso en el valor de pH del medio durante el tratamiento de concentraciones elevadas de diversos ésteres (Yanti *et al.*, 2014). Este subproducto es utilizado por las arqueas acetotrofas para la producción de metano.

El acetato de etilo se ha descrito como un disolvente fácilmente biodegradable en condiciones anaerobias (Henry *et al.*, 1996; Speece, 1983). A modo de ejemplo, Symons y Buswell (1933) degradaron en un reactor en discontinuo a escala de laboratorio operado en condiciones mesofílicas (33-35 °C)

hasta 12.8 g l⁻¹ de acetato de etilo, obteniendo una recuperación de carbono en el biogás del 91%. La relación entre metano y dióxido de carbono fue de 3.13 moles de CO₂ por cada 5 moles de CH₄ producido.

Degradación anaerobia de acetato de fenol

La degradación anaerobia de fenol hasta acetato en condiciones mesofílicas se puede realizar por varias vías metabólicas diferentes y requiere de un consorcio entre varios microorganismos (Levén *et al.*, 2012). Como ejemplo se muestran en la Figura 1.6 dos posibles rutas metabólicas: vía 4-hidroxibenzoato o vía caproato. En la primera de las rutas metabólicas parte del fenol es transformado en benzoato, mientras que en el resto se oxida hasta formar como producto final acetato, según la relación molar, cada 3 moles de fenol forman 2 moles de benzoato y 3 moles de acetato (Karlsson *et al.*, 1999). En la segunda de las rutas metabólicas mostradas en la Figura 1.6, la degradación de fenol tiene como intermediario el caproato, aunque esta ruta sólo ha sido descrita por Fang *et al.* (2006) durante la degradación de fenol en condiciones termofílicas.

Los estudios comparativos realizados sobre la degradación de este compuesto muestran la elevada dependencia de su degradación con la temperatura, siendo más eficiente la mineralización del fenol dentro del intervalo mesofílico (Levén y Schnürer, 2005; Levén *et al.*, 2006).

Los microorganismos que se encuentran relacionados con la degradación de fenol son los integrantes del género *Azoarcus* (Sueoka *et al.*, 2009; van Schie y Young, 1998), quienes son capaces de asimilar fenol bajo condiciones anaerobias en presencia de nitratos. Además, otros géneros que se encuentran relacionados con la degradación biológica de este compuesto, ya sea mediante la asimilación directa de fenol o de sus metabolitos, son *Pelagibacter*, *Microbulbifer*, *Pseudomonas* y *Thauera* (Sueoka *et al.*, 2009).

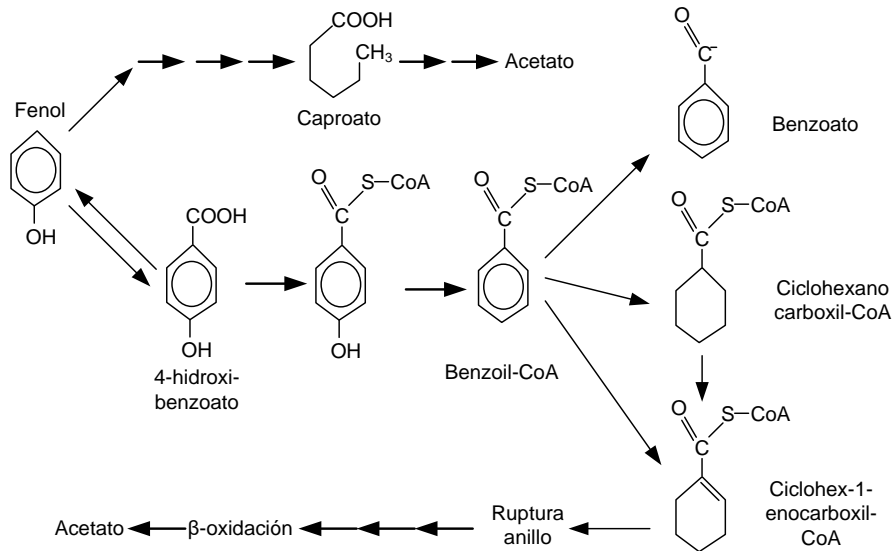


Figura 1.6.- Rutas de degradación anaerobia de fenol por la vía metabólica del caproato y del 4-hidroxibenzoato (adaptado a partir de Fang *et al.*, 2006; Levén *et al.*, 2012).

1.3 TRATAMIENTO ANAEROBIO COMO TECNOLOGÍA PARA EL CONTROL DE LAS EMISIONES DE COV

Convencionalmente, el control de las emisiones de COV mediante sistemas biológicos se realiza mediante reacciones bioquímicas aerobias, sin embargo existen muchas reacciones que intervienen en la degradación de ciertos contaminantes que únicamente se realizan bajo condiciones anaerobias, como son algunos hidrocarburos clorados (Deviny *et al.*, 2000). Además, los sistemas anaerobios permiten el tratamiento de cargas de contaminantes mayores que los aerobios (Lettinga, 1995a), reduciendo así el espacio requerido para el control de las emisiones.

A pesar de las ventajas de los sistemas anaerobios y de que los biolavadores estén considerados como una de las pocas tecnologías que pueden utilizarse bajo condiciones anaerobias para el tratamiento de una corriente gaseosa contaminada (Shareefdeen *et al.*, 2005), las referencias previas a esta tesis doctoral de este tipo de tecnología son escasas, habiéndose utilizado únicamente como tecnología para el control de emisiones de NO_x , SO_x y algunos COV que no se

degradan aerobiamente, sin llegar a probarse un prototipo a nivel de escala industrial.

Una tecnología híbrida en la que se acopla una torre lavadora a un reactor anaerobio de tipo RAFA fue utilizada para el tratamiento de percloroetileno por Parker *et al.* en 1999 (Singh *et al.*, 2005). Como los hidrocarburos clorados son relativamente insolubles en agua, durante la experimentación estos autores utilizaron una fase orgánica, aceite vegetal, añadidos al líquido de recirculación de la torre lavadora. Estudios posteriores realizados por Johnson *et al.* (2000) determinaron el uso de aceite vegetal como solución de lavado para realizar la transferencia desde el aire de una mezcla hidrocarburos clorados compuesta de diclorometano (DCM), tetracloroetileno (TCE) y tetracloruro de carbono (TC) en una torre lavadora asociada a un sistema híbrido con un reactor anaerobio de tipo RAFA. El aceite era tratado previamente a ser otra vez utilizado de nuevo como solución de lavado en un reactor anaerobio bifásico.

Esta tecnología se encuentra todavía en un punto incipiente en su desarrollo, aunque puede ser una alternativa para el tratamiento biológico de emisiones de COV. En este sentido, los resultados mostrados en esta tesis doctoral sientan las bases para el diseño y desarrollo de un biolavador de lecho granular para el tratamiento de una emisión de COV derivada del uso de tintas.

2 OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral consiste en el estudio y evaluación de la degradación anaerobia de disolventes orgánicos de uso habitual en el sector de la impresión flexográfica, y sienta las bases para el desarrollo e implantación a nivel industrial de una tecnología basada en el concepto de biolavador anaerobio para el control de las emisiones en aire de compuestos orgánicos volátiles de elevada solubilidad en agua. El objetivo general se ha concretado en:

1. Estudio experimental en reactores anaerobios de lecho expandido a escala de laboratorio de la puesta en marcha y operación prolongada a temperatura ambiente con un agua residual con presencia de una mezcla binaria y otra multicomponente de disolventes orgánicos característicos del sector de la impresión flexográfica.

Adicionalmente, se desarrollan otros dos objetivos secundarios que se detallan a continuación:

2. Estudio experimental de la influencia que la adición de ciertos metales pesados como micronutrientes tienen sobre el proceso biológico de degradación anaerobia con objeto de desarrollar procedimientos para la optimización de la adición de nutrientes.
3. Desarrollo y evaluación de la prueba de concepto de un biolavador anaerobio de lecho granular para el control de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles del sector de la impresión flexográfica.

El estudio experimental en reactores anaerobios se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

- a) Estudio experimental de la puesta en marcha bajo dos temperaturas de operación diferentes de 18 y 25 °C para la degradación de mezclas de disolventes orgánicos. Los experimentos se realizan para evaluar el tiempo necesario para la adaptación de los microorganismos a las condiciones de operación de temperatura y al tipo de sustrato seleccionado. Las temperaturas de operación utilizadas definen el intervalo de temperatura para la posible operación a nivel industrial.
 - Determinación del tiempo de adaptación para la degradación de una mezcla binaria compuesta por etanol y 1-metoxi-2-propanol y otra multicomponente compuesta por etanol, acetato de etilo, 1-metoxi-2-propanol, acetona e isopropanol, disolventes orgánicos habituales en las tintas empleadas en el sector flexográfico.

- b) Estudio experimental de la degradación anaerobia de disolventes orgánicos en condiciones de alimentación en continuo. Los experimentos se realizan para obtener un conjunto de parámetros de operación que permitan obtener elevadas eficacias de eliminación en el sistema para degradación de los disolventes en estudio. Este objetivo se puede concretar en los siguientes subobjetivos:
- Determinar la máxima capacidad de eliminación de 1-metoxi-2-propanol en presencia de etanol y la producción de metano en condiciones mesofílicas y psicofílicas, a fin de establecer la viabilidad técnica de esta tecnología para el tratamiento de los disolventes orgánicos en estudio.
 - Determinar las condiciones de operación que permitan el funcionamiento estable durante un largo periodo de tiempo para la degradación anaerobia de mezclas compuestas por etanol, 1-metoxi-2-propanol, acetato de etilo, isopropanol y acetona, a fin de evaluar la capacidad del sistema para degradar diferentes mezclas de disolventes utilizadas para diferentes necesidades de producción industrial.
- c) Estudio experimental de la degradación anaerobia de disolventes de uso industrial en condiciones de alimentación en discontinuo, con el fin de:
- Evaluar la respuesta de los reactores anaerobios ante interrupciones prolongadas de la alimentación de contaminante que se pueda producir en instalaciones industriales, y ante diferentes condiciones de alimentación en discontinuo, que incluya paradas nocturnas y de fin de semana en la alimentación de disolventes. Estas paradas cíclicas están asociadas a los turnos de trabajo, que pueden ser de 1 a 3 dependiendo de las necesidades de producción.
- d) Puesta a punto y aplicación de técnicas de biología molecular para la profundización del conocimiento del sistema anaerobio mediante el análisis de la variación de la población microbiana durante la operación de los reactores anaerobios y el estudio de su relación con los parámetros de operación. Este objetivo se desarrolla en tres etapas:

- Implementación y optimización de las técnicas de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) y secuenciación del gen ARNr 16S.
 - Análisis de la evolución de las poblaciones microbianas en el proceso de degradación anaerobia de 1-metoxi-2-propanol a 18 y 25 °C.
 - Estudio de la relación entre las especies identificadas a lo largo del periodo de operación con el funcionamiento del sistema anaerobio.
- e) Estudio de varias estrategias para fomentar la granulación de biomasa anaerobia parcialmente desgranulada durante la operación, a fin de determinar un procedimiento eficaz para su granulación aplicable en un reactor industrial. Para llevar a cabo este objetivo se estudiaron las siguientes estrategias: control de los parámetros de operación y adición de floculantes: aluminio y quitosan.

El estudio experimental de la adición de metales pesados se realiza con objeto de establecer las bases que permitan llevar a cabo la optimización de su dosificación como micronutrientes. Es decir, maximizar el rendimiento del proceso anaerobio, de forma que se mantengan en mínimos los costes de operación, mediante:

- Determinación experimental de las cinéticas de bioadsorción de metales pesados a diferentes temperaturas, en concreto cobalto suplementado como CoCl_2 o vitamina B_{12} .
- Estudio de la respuesta de la actividad metanogénica específica ante la adición de diferentes concentraciones de cobalto como CoCl_2 o vitamina B_{12} y de tungsteno, considerando su contenido en las diferentes fracciones en la biomasa, que determinan la biodisponibilidad de los metales.

El desarrollo y evaluación de la prueba de concepto de un biolavador anaerobio de lecho granular a escala de laboratorio, a fin de establecer las bases de esta tecnología para el posterior diseño de un prototipo a escala de planta piloto. Este objetivo incluye:

- Diseño, implementación y evaluación del funcionamiento en una prueba preliminar de concepto de biolavador anaerobio de lecho

56|Objetivos

granular a escala de laboratorio para el tratamiento de una emisión en aire de COV de elevada solubilidad en agua.

- Estudio de mejora del concepto de biolavador anaerobio de lecho granular a partir de la operación del montaje experimental.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MONTAJE EXPERIMENTAL

3.1.1 Reactor anaerobio RALF a escala de laboratorio

Los experimentos para la depuración de disolventes con un proceso biológico anaerobio se llevaron a cabo en tres reactores anaerobios de lecho fluidizado (RALF) a escala de laboratorio, operados en paralelo. En dos de los reactores (RALF 1 y RALF 2) se ha tratado una corriente de agua contaminada con etanol y 1-metoxi-2-propanol y en el tercero (RALF 3) se ha eliminado una mezcla multicomponente compuesta por etanol, acetato de etilo, 1-metoxi-2-propanol, isopropanol y acetona. En la Figura 3.1 se presenta el esquema del montaje experimental correspondiente a uno de los reactores.

El reactor biológico estaba construido en PVC transparente y se compuso de dos piezas cilíndricas de diferentes tamaños con una altura total de 172.5 cm. Tal y como se esquematiza en la Figura 3.1, los 4 L de volumen efectivo del reactor se encontraban en la parte inferior, que tiene una altura de 131.5 cm, siendo el diámetro interno de 6.5 cm hasta la altura de 120 cm. Esta parte del reactor dispuso de una doble pared de PVC por la cual circulaba el agua de refrigeración para mantener los reactores a la temperatura deseada. La temperatura estaba controlada a 18 °C por un refrigerador termostático (Polyscience SD15R-30, EEUU) y a 25 °C por un calefactor termostático (Julabo labortechnik GMBH F20-HC7, Alemania). Entre los 120 y 131.5 cm tenía forma cónica con un diámetro interno menor de 6.5 cm y mayor de 20 cm, sobre la que descansaba la otra pieza del reactor. Esta última pieza tenía de diámetro interno 20 cm y altura de 46.5 cm. La salida de la recirculación se encontraba a una altura de 150 cm desde la base del reactor, el deflector a una altura de 172.5 cm y la salida del efluente a 167 cm, siendo el volumen total del reactor de 18.6 litros. En la parte superior de cada uno de los reactores había una zona de decantación en la que se encontraba instalado un dispositivo de separación gas-líquido-sólido que evitaba la salida de sólidos suspendidos en el efluente y favorecía la evacuación del gas producido hasta un frasco lavador con una solución de NaOH e hipoclorito sódico para eliminar CO₂ y H₂S, por lo que el gas recogido al final se componía únicamente de metano. Los caudales de las corrientes de alimento y de recirculación se proporcionaban mediante bombas peristálticas (Watson-Marlow, EEUU). La entrada del alimento en el reactor se realizaba mediante un sistema de distribución compuesto por un tubo con diversos orificios introducido en la parte baja del reactor y un lecho de esferas de vidrio.

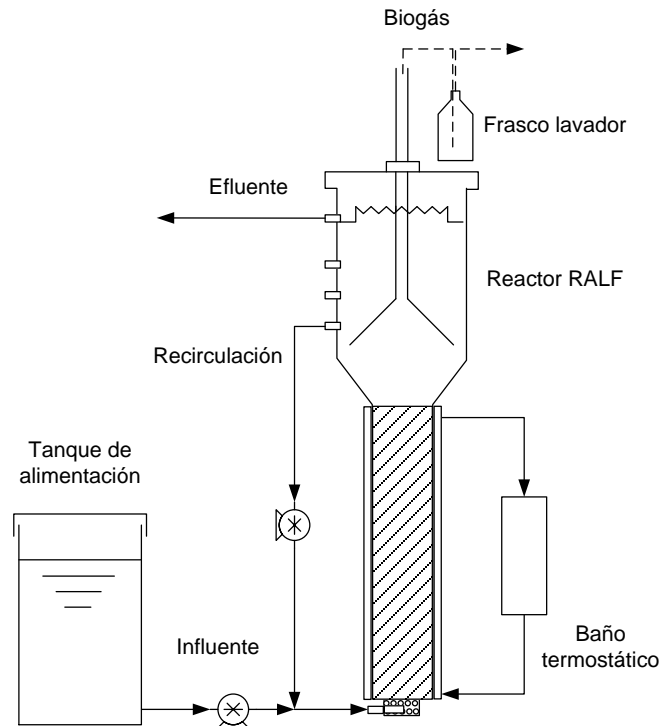


Figura 3.1.- Esquema del montaje experimental a escala de laboratorio.

El reactor RALF se operó con diferentes condiciones de carga orgánica y de alimentación. La alimentación de los reactores se realizó en continuo y en discontinuo.

3.1.2 Biolavador anaerobio de lecho granular a escala de laboratorio

En la Figura 3.2 se muestra el esquema del montaje a escala de laboratorio del sistema biolavador anaerobio de lecho granular para el tratamiento de una corriente gaseosa contaminada por compuestos orgánicos volátiles de elevada solubilidad en agua, formado por la combinación del reactor RALF descrito en la sección 3.1.1 y una torre lavadora. La transferencia del COV presente en la corriente de aire al agua se realizaba en la torre lavadora, de forma que se obtiene una corriente de aire limpio y una corriente de agua contaminada con disolventes. Esta torre lavadora estaba fabricada en PVC, con una longitud de 1.2 m y un diámetro interno de 6.3 cm. En el interior de la torre lavadora se introdujo un material de relleno compuesto por anillos de plástico de 15 mm (Flexiring, Koch-

Glistch B.V.B.A., Bélgica) dispuestos de forma desordenada, con un volumen total de 3.7 litros.

Este sistema también se compuso de un tanque de mezcla donde se almacenaba el agua contaminada con disolvente proveniente de la torre lavadora y se producía el agotamiento del oxígeno. A este tanque se aportaban nutrientes y alcalinidad desde el tanque de nutrientes y se alimentaba el reactor RALF, donde se degradaban anaeróbicamente los disolventes a metano y CO₂. El efluente del reactor anaerobio se recirculaba como agua de riego de la torre lavadora y, con ese fin, se almacenaba en el tanque de recirculación. Para favorecer el consumo de oxígeno en el tanque de mezcla y así evitar la entrada de agua con oxígeno disuelto dentro del reactor anaerobio se instaló un sistema de control de nivel que mantenía el volumen de agua por encima de los 4 litros. De esta forma, cuando se superaba este volumen, se accionaba la bomba de recirculación que llevaba el agua efluente del reactor depositada en el tanque de recirculación hasta la parte superior de la torre lavadora, provocando que el régimen de riego fuera intermitente. Los tanques de nutrientes, mezcla y de recirculación tienen un diámetro mayor de 25 cm, diámetro menor de 22.5 cm, altura de 26.5 cm y volumen de 10 L. Durante la experimentación el volumen de los tanques de mezcla y de recirculación se mantuvo en 7 litros, realizándose una purga diaria del tanque de recirculación de 1 litro. El volumen total de agua en el sistema fue de 29.6 litros.

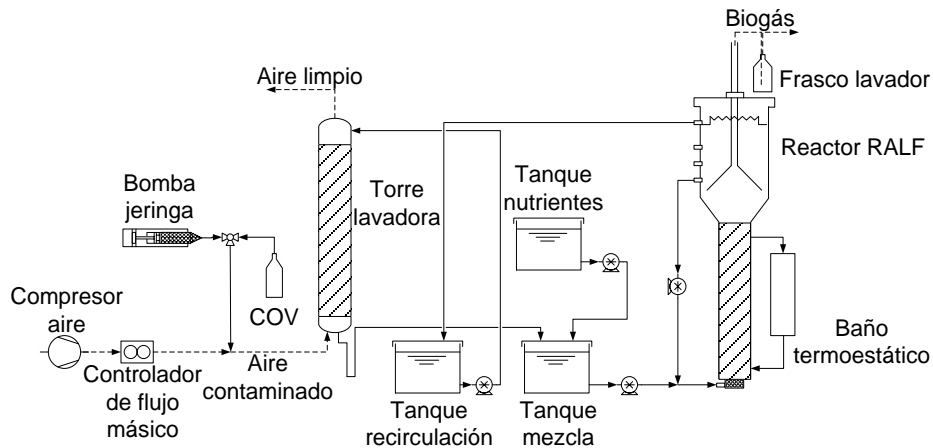


Figura 3.2.- Esquema del montaje experimental del biolavador anaerobio de lecho granular a escala de laboratorio.

El aire utilizado en los experimentos provenía de un compresor donde era acondicionado en dos etapas. La primera etapa consistía en la filtración del aire con el fin de eliminar las partículas y gotas de aceite, seguido de una segunda etapa en la que se eliminaba la humedad mediante un secado criogénico. El caudal de aire se ajustaba mediante controladores de flujo másico (EL-FLOW F-201AV, Bronkhorts Hi-Tech, Países Bajos). La contaminación del aire se realizaba mediante la inyección del caudal deseado de disolvente utilizando una bomba de jeringa (modelo infusion/withdraw NE 1000, New Era Pumps Systems Inc., EEUU). Esta bomba permitía realizar las acciones de llenado y vaciado de forma automática mediante un sistema de alimentación compuesto por una válvula de tres vías accionada neumáticamente. De esta forma se permitía la succión del disolvente desde el recipiente de alimentación para el llenado de la jeringa y la posterior inyección en la conducción de aire. La automatización de la alimentación de contaminante permitió el funcionamiento ininterrumpido con adición constante de disolvente, así como la parada de alimentación durante periodos preestablecidos.

3.2 PROPIEDADES DE LOS DISOLVENTES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Los compuestos utilizados en la experimentación de laboratorio fueron seleccionados como contaminantes habituales y mayoritarios de la industria flexográfica, excepto en el caso del fenol, con la finalidad de tener una

composición similar a la que se encontraría en una emisión industrial. Los compuestos seleccionados como representativos de la emisión industrial de una flexográfica fueron etanol, 1-metoxi-2-propanol, acetato de etilo, isopropanol y acetona. Además, se realizó un estudio con fenol, disolvente presente en el agua residual de diversos sectores industriales como es el farmacéutico o el refinado de petróleo. En la Tabla 3.1 se muestran las propiedades físicas de los diferentes compuestos utilizados en la experimentación seleccionados como representativos de las emisiones del sector flexográfico y del fenol (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; Kroschwitz *et al.*, 2007).

Tabla 3.1.- Propiedades físicas de los disolventes utilizados durante la experimentación.

Propiedad	Etanol	M2P	Acetato de etilo	IPA	Acetona	Fenol
Fórmula química	C ₂ H ₆ O	C ₄ H ₁₀ O ₂	C ₄ H ₈ O ₂	C ₃ H ₈ O	C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₆ O
Número CAS	64-17-5	107-98-2	141-78-6	67-63-0	67-64-1	108-95-2
Peso molecular	46.07	90.12	88.11	60.1	58	94.1
Punto de ebullición, °C ^(a)	78.32	120	77.1	83	56	181.7
Densidad del líquido, kg m ⁻³ ^(b)	789.3	920	897	790	790	1.07
Presión de vapor a 20°C, kPa	5.8	1.2	0.1	4.4	24	0.047
Solubilidad en agua a 20°C, g l ⁻¹	Miscible	Muy soluble	83	Miscible	Miscible	Miscible
Punto de inflamación, °C	13	38	7	11.7	-20	82
Temperatura de autoignición, °C	363	270	427	456	538	595
Límites de explosividad, % vol	3.3-19	1.9-13.1	2.2-11.5	2-12	2.15-13	1.3-9.5

M2P: 1-metoxi-2-propanol; IPA: isopropanol

^(a)para 1 atm

^(b)en condiciones normales

En la Tabla 3.2 se muestran los valores límite ambiental de exposición diaria (VLA-ED), para una jornada media de 8 horas diarias, y los valores límite ambiental de exposición de corta duración (VLA-EC) de los compuestos en estudio. Estos valores están de acuerdo con lo establecido en el RD 374/2001 y son establecidos por el Instituto Nacional de seguridad e Higiene en el Trabajo (2015).

Tabla 3.2.- VLA-EC y VLA-ED de los compuestos en estudio. De Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Compuesto	VLA-ED, mg m ⁻³	VLA-EC, mg m ⁻³
Etanol	-	1910
1-metoxi-2-propanol	375	568
Acetato de etilo	-	1400
Isopropanol	500	1000
Acetona	1210	-
Fenol	8	16

3.3 COMPOSICIÓN DE NUTRIENTES

3.3.1 Reactor anaerobio de lecho fluidizado

En la operación con los reactores anaerobios de lecho fluidizado se adicionaron nutrientes en la misma solución de alimento. Esta solución de alimento también se encontraba compuesta por los disolventes a degradar y bicarbonato sódico para mantener el nivel adecuado de alcalinidad. Las necesidades de alcalinidad para mantener el reactor a pH neutro fueron calculadas para una temperatura de 18 °C y una concentración de CO₂ en fase gas del 35% para ambos reactores (Tchobanoglous *et al.*, 2003). En la Tabla 3.3 se muestra la composición de nutrientes utilizada.

Tabla 3.3.- Composición de nutrientes del influente de los reactores anaerobios de lecho fluidizado.

Compuesto	Concentración, mg g DQO ⁻¹	Compuesto	Concentración, µg g DQO ⁻¹
NH ₄ Cl	15.7	FeCl ₃ ·6H ₂ O	420.8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.6	H ₃ BO ₃	114.3
KCl	6.1	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	13.2
Extracto de levadura	7.5	CuCl ₂ ·2H ₂ O	13.4
		MnCl ₂ ·4H ₂ O	144.1
		(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	62.5
		Al ₂ O ₃	59.5
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	161.5
		NiSO ₄ ·6H ₂ O	44.7
		EDTANa	100
Compuesto	Concentración, mg l ⁻¹		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	146.7		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	334.5		
NaHCO ₃	5000		

3.3.2 Biolavador anaerobio de lecho granular

La adición de nutrientes y bicarbonato sódico como fuente de alcalinidad al biolavador anaerobio de lecho granular se realizó de forma continuada, suministrando la disolución concentrada descrita en la Tabla 3.4. La adición de dicha solución se llevó a cabo en el tanque de mezcla mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow, EEUU) con una dosis de 1 l d⁻¹.

Tabla 3.4.-Composición de la disolución de nutrientes utilizada en el biolavador anaerobio de lecho granular.

Compuesto	Concentración, g l ⁻¹	Compuesto	Concentración, mg l ⁻¹
NH ₄ Cl	1.2	FeCl ₃ ·6H ₂ O	18.15
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.2	H ₃ BO ₃	4.93
KCl	0.2	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.57
Extracto de levadura	0.2	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.58
		MnCl ₂ ·4H ₂ O	6.21
		(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	2.70
		Al ₂ O ₃	2.56
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	6.96
		NiSO ₄ ·6H ₂ O	1.93
		EDTANa	4.31

3.4 PROPIEDADES DE LOS COAGULANTES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Durante el presente trabajo de tesis doctoral se llevó a cabo un estudio sobre la potenciación de la formación de gránulos con coagulantes tras observarse un fenómeno de destrucción de gránulos dentro del reactor, que puede ser provocado, entre otras causas, por una elevada velocidad superficial (Liu *et al.*, 2008) o una deficiencia en la transferencia del sustrato dentro del gránulo (Aiyuk y Verstraete, 2004). En este estudio se utilizaron como fomentadores de la granulación los siguientes coagulantes: aluminio y quitosan; los cuales se describen a continuación.

3.4.1 Aluminio

El aluminio es un metal trivalente utilizado como coagulante en el tratamiento de aguas para el consumo humano y en aguas residuales. La características físico-químicas de este compuesto favorecen la formación de

gránulos de biomasa anaerobia, como constataron Abbasi *et al.* (2013), Boonsawang *et al.* (2008) y Yu *et al.* (2001).

En este estudio se utilizó como fuente de aluminio una solución comercial de policlorosulfato de aluminio llamado Kemira PAX-40 (Kemira Ibérica, España). Las especificaciones de este producto se detallan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5.- Especificaciones técnicas de Kemira PAX-40.

Parámetro	Valor
Aluminio (Al ³⁺)	5 ± 0.2%
Al ₂ O ₃	9.5 ± 0.3%
Hierro (Fe _{Total})	<0.01%
Cloruro (Cl ⁻)	11.5 ± 1.0%
Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	1.5 ± 0.5%
pH a 20 °C	2 ± 0.5
Densidad	1.21 ± 0.02 g cm ⁻³
Viscosidad a 20 °C	10 ± 5 mPa
Basicidad	41 ± 5%

3.4.2 Chitosan

El chitosan es un polisacárido lineal compuesto por D-glucosamina y N-acetil-glucosamina que se produce a partir de la deacetilación del quitín; polímero de cadena larga, derivado de la celulosa, que se encuentra en la naturaleza formando parte de paredes celulares de hongos, esqueletos de artrópodos e insectos, en la rábula de los moluscos y en los picos de los cefalópodos.

El chitosan empleado en este estudio se adquirió en forma de polvo, fabricado a partir de caparazones de cangrejos, con un grado de deacetilación entre el 75 y el 85%. Debido a la baja solubilidad en agua de este compuesto, el chitosan comercial requirió una preparación previa a su uso, en la que se diluyó en una solución acuosa de ácido acético al 1% hasta alcanzar una concentración de chitosan del 1% en peso. La solución resultante, con una viscosidad entre 200 y 800 cps, se aplicó a la biomasa anaerobia.

3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

La determinación de la calidad del efluente permite llevar a cabo el seguimiento y la caracterización del proceso. Con este objetivo se determinó a diario la temperatura, el pH, la conductividad y el potencial redox. Durante toda la experimentación también se determinó la demanda química de oxígeno (DQO), la

concentración de nutrientes (nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio, sodio, calcio y azufre), la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), la alcalinidad, la concentración de sólidos en suspensión (SS), la concentración de sólidos en suspensión volátiles (SSV), la concentración de carbono orgánico total (COT), de carbono inorgánico (CI) y carbono total (CT). Estas medidas y determinaciones se realizaban con una periodicidad de 2 veces por semana, excepto en la operación con alimentación en discontinuo que se realizaban cada 2 horas durante las primeras 8 horas tras iniciar los ciclos de alimentación.

El seguimiento de la temperatura, pH y conductividad se realizó mediante un sensor multiparamétrico (pH/Cond 340i, WTW, Alemania). El potencial redox se midió con un electrodo SentixORP (WTW, Alemania).

3.5.1 Determinación de la concentración de DQO, del carbono orgánico total, carbono inorgánico y carbono total

El rendimiento del sistema anaerobio fue determinado a partir del consumo de la DQO y la concentración de carbono orgánico soluble presente en el efluente. Se consideró despreciable la DQO perdida como sólidos suspendidos en el efluente, por lo que la muestra filtrada se analizó con el test fotométrico en cubetas de DQO Spectroquant® (114540 Spectroquant®, Merck KGaA, Alemania) y el análisis de carbono orgánico total se realizó con un analizador de carbono para muestras líquidas (Total Organic Carbon Analyzer, TOC-VC_{CHS}, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Este equipo también se utilizó para la determinación de carbono inorgánico y el carbono total solubles.

El calibrado del analizador de carbono se realizó de forma periódica con una solución patrón compuesta por carbonato sódico y bicarbonato sódico para el calibrado del carbono inorgánico y de hidrógeno ftalato potásico para el calibrado de carbono total. El carbono orgánico se obtiene por la diferencia entre ambos. El calibrado del equipo se llevó a cabo para un intervalo de concentraciones entre 0 y 100 mg C l⁻¹.

3.5.2 Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles

La concentración de los ácidos grasos volátiles (AGV) y alcalinidad fue determinada según el método de valoración ácido-base de 5 puntos descrito por Moosbrugger *et al.* (1992), que se basa en el equilibrio químico de las especies involucradas. Este método consiste en la valoración con ácido clorhídrico 0.1 M de la muestra previamente filtrada y diluida. Se determina el volumen de ácido

necesario para obtener los valores de pH de 6.7, 5.9, 5.2, y 4.3. El cálculo de la alcalinidad y de AGV se determinó mediante el ajuste de la curva teórica de valoración llevada a cabo por un programa informático distribuido por los autores del método analítico, teniendo en cuenta la concentración de ácidos y bases débiles presentes en la muestra, como fosfatos, amonio y sulfuros.

3.5.3 Determinación del contenido en sólidos

El contenido en sólidos se determinó según los métodos 2540B, 2540D y 2540E indicados en Standard Methods (Clesceri *et al.*, 1998).

Determinación de sólidos totales y sólidos volátiles

Los sólidos totales (ST) se analizaron mediante la evaporación a 105 °C de una muestra homogeneizada en una cápsula de peso conocido. El incremento del peso respecto a la cápsula vacía representan los sólidos totales de la muestra. Para obtener los sólidos volátiles (SV) se toma el residuo del análisis anterior y se calcina a 550 °C durante 2 horas, siendo los sólidos volátiles el peso perdido durante este proceso.

Determinación de sólidos suspendidos y sólidos suspendidos volátiles

Los sólidos suspendidos (SS) se determinan a partir del filtrado de la muestra homogeneizada en un filtro de fibra de vidrio de peso conocido. El residuo retenido en el filtro se seca a 105 °C y se pesa. La diferencia de pesada entre las dos medidas representa el contenido en sólidos suspendidos de la muestra. El residuo obtenido durante el análisis se calcina a 550 °C y se pesa, siendo la diferencia entre las dos pesadas la cantidad de sólidos suspendidos volátiles (SSV).

3.5.4 Determinación de la concentración de nutrientes

La determinación de la concentración de nutrientes se realizó a partir de la muestra filtrada en la determinación de los SS.

Determinación mediante método colorimétrico

La concentración de amonio y fósforo se determinaron mediante métodos colorimétricos. La concentración de amonio se analizó utilizando un kit comercial de amonio Spectroquant® (100683 Spectroquant®, Merck KGaA, Alemania) y el método utilizado para la determinación de fósforo fue el método azul del ácido

ascórbico, correspondiente al 4500-PE del Standard Methods (Clesceri *et al.*, 1998).

Determinación mediante cromatografía iónica

Para la determinación de los cationes amonio, sodio, potasio, magnesio y calcio y de los aniones fosfato, cloro, nitrato y sulfato mediante cromatografía iónica se utilizó un cromatógrafo iónico (883 Basic IC plus, Metrohm, Suiza) con detección conductimétrica. Para el análisis de aniones se utilizó la supresión química y una columna Metrosep A Supp3 (250 mm largo x 4.6 mm de diámetro interno) y para el de cationes una columna Metrosep C4-250/4.0 (250 mm largo x 4 mm diámetro interno).

El equipo se calibraba periódicamente tanto para medir cationes como para medir aniones. El patrón de cationes se realizaba con un multipatrón preparado a partir de disoluciones estándar de 1000 ppm. El patrón de aniones se realizaba de manera análoga.

3.5.5 Determinación de la composición de las mezclas de COV

Para determinar la composición de las mezclas de disolventes en el líquido se utilizó un cromatógrafo de gases (modelo 7890A, Agilent Technologies, EEUU) equipado con un detector de ionización de llama, una columna Restek Rtx-VMS (30 m largo x 0.25 mm diámetro interno x 1.4 μm tamaño partícula) y utilizando helio como gas portador (caudal: 25 ml min^{-1}). Las muestras fueron introducidas al cromatógrafo por inyector de división a una temperatura de 190 °C. Para la desorción de los compuestos de la columna se utilizó una rampa de temperatura (35 °C durante 21 minutos y después el aumento de 10 °C min^{-1} hasta alcanzar 110 °C). El detector se encontraba a una temperatura de 240 °C.

3.5.6 Determinación de la concentración total de COV en la fase gas mediante análisis de hidrocarburos totales

El equipo utilizado para la determinación de la concentración de COV en la fase gas es un analizador de hidrocarburos totales (Nira Mercury modelo 904, Spirax-Sarco, España) equipado con un detector de ionización de llama, a una temperatura de detección de 110 °C y una bomba de succión para la toma de muestra de gases, con una aspiración de 2500 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. El calibrado se realizaba periódicamente utilizando una mezcla sintética estándar de propano y nitrógeno gas (Carburos metálicos, España) de 1000 ppm_v de concentración.

3.5.7 Determinación de la producción y composición de biogás

La determinación de la producción de biogás se realizó mediante el uso de dos equipos de medida. Uno de los equipos utilizado fue un gasómetro de desplazamiento de líquido, que estaba compuesto por un cilindro aforado parcialmente sumergido en agua desionizada en un vaso abierto. El biogás generado era conducido a la parte inferior del cilindro, desplazando el líquido que contenía. El cálculo del biogás producido se realizaba a partir del volumen de líquido desplazado en un periodo de tiempo determinado. El otro equipo utilizado fue un medidor de biogás modelo MGC-10 PMMA (Ritter, Alemania).

Para la determinación de la composición del biogás producido en los reactores anaerobios también se utilizaron dos equipos diferentes: cromatógrafo de gases y medidor con un detector de fotoionización (COMBIMASS® GA-m, Binder, Alemania). El cromatógrafo de gases (modelo 7890A, Agilent Technologies, EEUU) se componía de un detector de conductividad térmica y dos columnas conectadas en serie, Carbosieve S-II (1 m longitud x 1/8" diámetro interno x 2.1 mm SS) y SP-1700 (9 m longitud x 1/8" diámetro interno x 2.1 mm SS), utilizando helio como gas portador. La temperatura del horno y del detector fueron 70 y 175 °C, respectivamente.

3.5.8 Ensayos en reactores en discontinuo

Los ensayos en reactores en discontinuo se utilizaron para determinar la actividad metanogénica específica y el potencial bioquímico de metano. Estos ensayos se realizaron en un Automatic Methane Potential Test System (modelo: AMPTS II, Bioprocess Control, Suecia), que se compone de 15 reactores de 0.5 L con agitación discontinua (60s agitado/60s parado) a 112 revoluciones por minuto. Los reactores se mantuvieron a la temperatura deseada mediante un baño termostático. El biogás producido en cada reactor era conducido a un vial con una solución alcalina (NaOH 3M) para retener el CO₂, permitiendo únicamente el paso de metano a la unidad de medida.

Los experimentos para determinar la actividad metanogénica específica y el potencial bioquímico de metano se realizaron al final de los ensayos realizados con una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol y antes de comenzar y al finalizar el ensayo con chitosan como floculante. Estos análisis se llevaron a cabo por triplicado, utilizando como sustrato 2.5 g DQO l⁻¹ del compuesto en estudio y con una relación inóculo/sustrato de 3. Al final de los ensayos con la mezcla binaria se utilizaron etanol o 1-metoxi-2-propanol, pero al finalizar los ensayos con chitosan

se utilizó una mezcla 4:1 en masa de etanol y 1-metoxi-2-propanol, respectivamente. El pH se reguló con la adición de 5 g $\text{NaHCO}_3 \text{ l}^{-1}$, además se añadieron macro y micronutrientes en las concentraciones que se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Composición de la disolución de nutrientes utilizada en los ensayos en reactores en discontinuo utilizando etanol y 1-metoxi-2-propanol como sustrato.

Compuesto	Concentración, mg l^{-1}	Compuesto	Concentración, $\mu\text{g l}^{-1}$
NH_4Cl	39.3	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1052
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	14	H_3BO_3	285.8
KCl	15.2	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33
		$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33.5
		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	360.3
		$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	156.3
		Al_2O_3	148.8
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	403.8
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	332.5	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	111.8
NaHCO_3	5000	EDTANa	250

Los ensayos para determinar la afección de la adición de diferentes concentraciones de metales, cobalto y tungsteno, en la actividad metanogénica específica durante la degradación de fenol fueron realizados utilizando como sustrato una mezcla de acetato sódico y fenol en una relación en DQO 80:20, con una concentración de 3.6 g DQO l^{-1} y la solución de nutrientes descrita en la Tabla 3.7. A esta solución de nutrientes se le adicionaron diferentes concentraciones de cobalto, suplementado en forma de CoCl_2 o vitamina B_{12} , o de tungsteno, suplementado como Na_2WO_4 .

Tabla 3.7.- Composición de la disolución de nutrientes utilizada en los ensayos en reactores en discontinuo durante el estudio del efecto de la dosificación de cobalto o tungsteno en el tratamiento de fenol.

Compuesto	Concentración, mg l ⁻¹
NaCl	1·10 ⁴
NaHCO ₃	18.3·10 ³
K ₂ HPO ₄	1.05·10 ³
NaH ₂ PO ₄	0.5·10 ³
NH ₄ Cl	1020
CaCl ₂ ·2H ₂ O	48
MgCl ₂ ·6H ₂ O	54
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.2
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.3
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.02
ZnCl ₂	0.03
H ₃ BO ₃	0.03
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.05
Na ₂ SeO ₃	0.06
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.03
EDTANa	0.6
Resazurina	0.3
Extracto de levadura	1.2
HCl, 35%	6·10 ⁴ ml l ⁻¹

La actividad metanogénica específica fue evaluada como la máxima producción de metano por unidad de biomasa y por unidad de tiempo, siendo sus unidades ml CH₄ g⁻¹ SSV d⁻¹. El potencial bioquímico de metano fue determinado por la acumulación de metano producido por unidad de sustrato orgánico aportado, siendo sus unidades ml CH₄ g⁻¹ DQO.

3.5.9 Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula del fango anaerobio fue determinado a partir de dos metodologías diferentes: procedimiento de tamizado durante el experimento con aluminio como floculante y medición en un analizador de tamaño de partícula durante el experimento con quitosan como floculante.

Procedimiento de tamizado

La distribución de tamaño de partícula se obtuvo mediante tamizado sucesivo de muestras de 25 ml de fango proveniente de los reactores, utilizando tamices con pasos de luz de 0.25, 0.50, 0.85, 1.00, y 2.00 mm, según el método descrito por Laguna *et al.* (1999). Una vez tamizada la muestra se lavaron los tamices con agua para recuperar el fango depositado en ellos y se centrifugó la solución resultante para eliminar el exceso de agua. Se midieron los sólidos suspendidos y los sólidos suspendidos volátiles del fango obtenido a fin de determinar la distribución del tamaño de partícula en función del porcentaje en masa de la biomasa.

Medición en un analizador de tamaño de partícula

El analizador de tamaño de partícula utilizado fue Mastersizer 2000 (Malvern, Reino Unido). El principio de medida de este equipo es la técnica de difracción láser, que se basa en la medición de la intensidad de la luz dispersada cuando un haz de luz láser pasa a través de la muestra. Una vez medido, este resultado es analizado por el software del equipo para calcular el tamaño de partícula. El resultado obtenido mediante este método nos indica el porcentaje de volumen de partículas de un determinado tamaño en relación con el conjunto total de partículas, independientemente de la cantidad de biomasa analizada.

3.5.10 Medición de la turbidez

La turbidez fue medida con un turbidímetro de sobremesa (Turbiquant® 1500 IR/T, Merck, Alemania). El principio de medida de este equipo es la nefelometría, que es un procedimiento analítico basado en la dispersión de la luz que atraviesa un medio transparente en el que hay partículas sólidas. Para la realización de las mediciones utiliza una fuente de luz LED IR (infrarrojo), con una longitud de onda de 860 nm, conforme con la norma EN ISO 7027.

3.5.11 Ensayos cinéticos de bioadsorción de cobalto

Estos ensayos se realizaron durante el estudio de la dosis óptima de micronutrientes durante el tratamiento anaerobio de un agua residual con fenol. Este trabajo fue llevado a cabo durante una estancia en la Delft University of Technology bajo la supervisión del doctor Henri Spanjers.

Los experimentos de bioadsorción en discontinuo se llevaron a cabo con el fin de determinar las cinéticas de bioadsorción del cobalto en forma de CoCl_2 y

vitamina B₁₂. Estos experimentos se realizaron en botellas de vidrio con un volumen de 1 L, en las que se introdujeron 5 mg Co l⁻¹, en forma de uno de los compuestos de cobalto en estudio en un volumen de 500 ml de agua destilada. A estas soluciones se les añadió 5 g NaCl, 9.15 g NaHCO₃, 0.57 g K₂HPO₄ y 0.23 g NaH₂PO₄ (pH=8). Posteriormente se burbujeó nitrógeno durante 3 minutos para desplazar el oxígeno disuelto. Después se añadieron 20 g de biomasa húmeda y se volvió a burbujear nitrógeno durante 2 minutos. Los reactores fueron incubados en ausencia de sustrato orgánico a la temperatura deseada, 25 ó 35 °C, en una incubadora orbital (New Brunswick, Innova 44) con una agitación constante a 150 rpm.

Con el experimento en marcha se tomaron muestras de 5 ml de volumen a diferentes intervalos de tiempo durante 3 días, al principio se recogieron muestras con mayor frecuencia, cada 5, 10 y 20 minutos, y luego se fue espaciando. Las muestras se filtraron a través de un filtro de jeringa de poliétersulfona de 0.45 µm (VWR) y se diluyó con ácido nítrico 3 % v/v.

La bioadsorción de cobalto sigue el modelo de pseudo-segundo orden desarrollado por Ho y McKay (1999). Este modelo se basa en que el cobalto puede quedar retenido en dos tipos de centros activos diferentes. En este caso se asume la dependencia cuadrática de la velocidad de bioadsorción con la diferencia entre la cantidad de cobalto adsorbida una vez alcanzado el equilibrio y la concentración adsorbida en un instante determinado.

$$\frac{dq_t}{dt} = K_2 (q_e - q_t)^2 \quad (3.1)$$

donde q_e es la masa adsorbida en el equilibrio (mg g⁻¹), q_t es la masa adsorbida en el tiempo t (mg g⁻¹) y K_2 es la constante de velocidad de pseudo-segundo orden (g mg⁻¹ h⁻¹).

Integrando esta ecuación entre los límites $t=0$ a $t=t$ y $q_t=0$ a $q_t=q_t$, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{t}{q} = \frac{t}{q_e} + \frac{1}{K_2 + q_e^2} \quad (3.2)$$

donde h es la tasa inicial de bioadsorción (mg g⁻¹ h⁻¹) y se calcula según la siguiente ecuación:

$$h = K_2 q_e^2 \quad (3.3)$$

3.5.12 Análisis del contenido de metales de la biomasa

El contenido en metales de la biomasa se determinó mediante un proceso de extracción, según la extracción secuencial modificada de Tessier propuesta por Hullebusch *et al.* (2005), y posterior análisis con ICP-OES (Spectro Arcos, Alemania). La extracción se realizó en cuatro pasos secuenciados mostrados en la Tabla 3.8. En el primer paso, para obtener la fracción intercambiable de los metales, se disolvió 1 g sólidos totales (ST) de biomasa en 10 ml de acetato amónico (1 M) y se incubó en una incubadora orbital (New Brunswick, Innova 44) durante 1 hora a 20 °C. Las muestras resultantes se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de jeringa de poliétersulfona de 0.45 µm (VWR) y se diluyó con ácido nítrico 3 % v/v. Para obtener la fracción de metales ligada a los carbonatos, la muestra sólida se diluyó en 10 ml de ácido acético 1 M y se incubó durante 1 hora a 20 °C. Tras la incubación se repitió el proceso de centrifugado de la muestra. La fracción de metales ligada a la materia orgánica y los sulfuros fue obtenida mediante la dilución de la muestra sólida resultante en 5 ml peróxido de hidrógeno al 30%, manteniendo un pH de 2, y se incubó durante 3 horas a 35 °C, realizándose el mismo procedimiento de centrifugado que en los pasos anteriores al finalizar la incubación. En el último paso se obtuvo la fracción residual de metales mediante la dilución del sólido resultante del paso anterior en 10 ml de agua regia (relación HCl:HNO₃ de 3:1) y se digirió en un horno microondas (Milestone MLS 1200 Mega, Bérgamo, Italia) durante 28 minutos a diferentes potencias (2 min a 250 W, 2 min a 0 W, 5 min a 250 W, 5 min a 400 W y 14 min a 650 W). Después de enfriarse las muestras se siguió el mismo procedimiento de filtrado que en los pasos anteriores.

Tabla 3.8 Condiciones de extracción requeridas y agentes extractores para llevar a cabo el método extracción secuencial en biomasa anaerobia. Adaptado de Hullebusch *et al.* (2005).

Fracción	Agente extractor	Condiciones de extracción	
		Tiempo de agitación	Temperatura
Intercambiable	10 ml NH ₄ CH ₃ COO 1M	1 h	20°C
Carbonatos	10 ml CH ₃ COOH 1M	1 h	20°C
Materia orgánica y sulfuros	5 ml H ₂ O ₂ 30% (pH=2)	3 h	35°C
Residual	10 ml aqua regia (HCl:HNO ₃ 3:1)		Horno microondas

3.5.13 Estudio de las poblaciones microbianas

La estructura de las comunidades microbianas se determinó mediante la técnica de biología molecular de electroforesis con gradiente desnaturalizante y posterior identificación de las especies mediante la secuenciación simple con el método Sanger. Previo al análisis mediante la electroforesis con gradiente desnaturalizante se precisa de la extracción del material genético y su amplificación. El procedimiento analítico es una adaptación del desarrollado por Pérez *et al.* (2013) para el análisis de las comunidades bacterianas en biofiltros percoladores.

Extracción del material genético

La extracción del material genético de la biomasa anaerobia se realizó con un kit comercial para muestras de suelo (FastDNA SPIN, MP Biomedicals, EEUU). La extracción se comprobó mediante la determinación de la concentración de ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermoscientific, EEUU).

Amplificación del material genético

El material genético aislado en la fase anterior se utilizó como molde para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, dos regiones variables de los operones ribosomales microbianos del ARNr 16S de los procariontes. Los reactivos utilizados fueron: 10x ExTaq buffer, dNTP con concentración de 2.5 mM y Ex Taq con concentración 5 unidades μl^{-1} (Takara, Japón). Los iniciadores utilizados para la amplificación de *Bacteria* fueron el oligonucleótido universal F357, con la secuencia 5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3', y el R518, con la secuencia 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'. Para el análisis en gel de gradiente desnaturalizante es necesario unir el oligonucleótido F357 a una grapa GC para evitar que las cadenas de ADN se separen por completo, obteniendo el iniciador F357GC, con secuencia 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3', con concentración de 25 μM (Metabion, Grupo Taper, España). Para la amplificación de *Archaea* se utilizaron los iniciadores ARC787F, con la secuencia 5'-ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC-3', ARC1059R, con secuencia 5'-GCC ATG CAC CWC CTC T-3' y ARC787F-GC, con secuencia 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAT TAG ATA CCC SBG TAG TCC-3', con concentración de 10 μM (IDT, Condalab, España). Las cantidades de cada reactivo para las diferentes reacciones se muestran en la Tabla 3.9. El volumen final de la muestra fue de 50 μl .

Tabla 3.9 Reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de *Bacteria* y *Archaea*.

Reactivo	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>
	Volumen, μl	Volumen, μl
10 ExTaq Buffer	5	5
dNTP	4	4
Iniciador F	1	2.5
Iniciador R	1	2.5
Ex Taq	0.15	0.15
Agua Milli Q	37.85	25.85
Muestra de ADN	1	10

La amplificación del material genético se realizó en un termociclador (MyGene L Series Peltier Thermal Cycler, Hangzhou LongGene Scientific Instruments, China). Las características del procedimiento desarrollado para la amplificación de *Bacteria* y *Archaea* se muestran en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10.- Procedimiento para la amplificación de *Bacteria* y de *Archaea*.

Fase	Temperatura, $^{\circ}\text{C}$	Tiempo, min	Ciclos	
			<i>Bacteria</i>	<i>Arquea</i>
Desnaturalización inicial	94	5	1	1
Amplificación	Desnaturalización	94	1	
	Anillamiento	65	00:30	19
	Elongación	72	1	19
Amplificación	Desnaturalización	94	1	
	Anillamiento	55	00:30	9
	Elongación	72	1	12
Elongación final	72	10	1	1

El resultado de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v), disuelta en tampón tris-acetato EDTA (TAE 1x) con $0.06 \mu\text{l ml}^{-1}$ de Eurosafe (Euroclone, Italia). Una vez solidificado e inmerso en la cubeta de electroforesis (Biocom, Reino Unido) se cargaron en diferentes pocillos $5 \mu\text{l}$ de cada muestra diluida con $0.8 \mu\text{l}$ de azul de bromofenol y $1.5 \mu\text{l}$ del marcador DNA Ladder (Sharmass 100, Euroclone, Italia). Tras la carga de las muestras y del marcador se aplicó una corriente de 100 V durante 30 minutos. Una vez acabada la electroforesis, el resultado se visualizó con luz ultravioleta en un transiluminador (Minibis Pro, DNR Bio-imaging Systems, EEUU).

Electroforesis con gradiente desnaturalizante

El análisis de electroforesis con gradiente desnaturalizante es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para poder realizar la separación de los fragmentos de ADN, se utiliza un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturalizantes del ADN, como la urea y la formamida, incorporados a lo largo de un gel de poliacrilamida (8% v/v). Durante el análisis el gel se mantiene la temperatura constante (60 °C) y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida a la que las cadenas se separan, disminuyendo o interrumpiendo el desplazamiento en el gel. Las cadenas de ADN se separan a una concentración determinada de agentes desnaturalizantes dependiendo del contenido de dobles o triples puentes de hidrógeno, es decir, si los pares de bases son de adenina-timina o de citosina-guanina (Myers *et al.*, 1987). El gradiente óptimo de desnaturalización para las muestras amplificadas fue determinado previamente, así como las condiciones de electroforesis, tiempo y voltaje aplicados. Para el análisis de los fragmentos de ADN de *Bacteria* se utilizó un gradiente desnaturalizante entre 20 y 35% y, para las muestras en la que se han amplificado los fragmentos de *Archaea*, un gradiente entre 30 y 45%.

La composición de las soluciones desnaturalizantes de baja y alta densidad utilizadas para el análisis de las poblaciones microbianas se muestra en la Tabla 3.11. A excepción del sellado superior (CAP), el gradiente desnaturalizante del gel de poliacrilamida se realizó con un sistema generador de gradiente (Hoefer SG 100, EEUU) al que se añadían las soluciones desnaturalizantes de baja y alta intensidad. El gel de poliacrilamida se realizó en un sistema de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (VWR Scientific, EEUU).

Tabla 3.11.- Composición de los geles de poliacrilamida para el análisis de electroforesis con gradiente desnaturizante.

Compuesto	CAP	<i>Bacteria</i>		<i>Archaea</i>	
		20%	35%	30%	45%
Agua milli Q, ml	3.6	9.5	8	8.5	7
Acrilamida, ml	1.3	3	3	3	3
TAE 50x, ml	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3
Urea, g		1.3	2.2	1.9	2.8
Formamida, ml		1.2	2.1	1.8	2.7
Glicerol, ml		0.3	0.3	0.3	0.3
APS*, 10% (p/v), μ l	22.5	67.5	67.5	67.5	67.5
TEMED**, μ l	10	30	30	30	30

*Peroxidisulfato de amonio, **Tetrametiletilendiamina

Una vez polimerizado el gel, se introduce en la cubeta de electroforesis con 7 litros de TAE 1x y se cargaron 20 μ l de muestra mezclados con 2.5 μ l de azul de bromofenol en cada pocillo. Tras cargar las muestras se iniciaba la electroforesis, aplicando el siguiente programa: 5 min a 50V, 2 h a 150V y 1h a 200V. Al acabar se realizaba la tinción con Eurosafe (Euroclone, Italia), con una concentración de 0.045 μ l ml⁻¹, en una cubeta con 400 ml de TAE 1x durante 40 minutos (10 minutos en movimiento, 30 minutos en reposo). Seguida a la tinción se realizaba el lavado del tinte sumergiendo el gel en agua desionizada durante 20 minutos. Por último, se visualizaba el gel en el transiluminador con luz ultravioleta. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa Image J (National Institutes of Health, EEUU).

Una vez concluido el análisis de las bandas obtenidas en el gel se procedió a la recuperación del ADN contenido en las bandas individuales para su posterior identificación. Para ello, se seleccionaron las bandas más representativas y se cortaron con un bisturí estéril. Las bandas se colocaron en microtubos estériles con 30 μ l de agua de grado molecular y se les aplicó una rotura física. Se incubaron durante 12 horas a 4 °C para que, posteriormente, con el sobrenadante resultante se realizara la amplificación de material genético, tal y como se ha indicado anteriormente. El producto de la amplificación se utilizó para comprobar que no se había producido la contaminación con otras especies que contenía la muestra original mediante otro análisis de electroforesis con gel desnaturizante. Previamente a la secuenciación, el ADN obtenido de las bandas cortadas se purificó de los productos utilizados durante la amplificación con un kit comercial (High pure PCR product purification kit, Roche, Suiza).

Secuenciación

La secuenciación del ADN recuperado del contenido de las bandas individuales se realizó mediante el método Sanger modificado o método de secuenciación por dideoxinucleótidos en el Servicio de Genómica de la Universitat de València. Este método se basa en la generación de fragmentos de ADN que terminan en una de las cuatro bases (adenina, guanina, citosina y timina) y que poseen marcadores fluorescentes que emiten a diferentes longitudes de onda en función de la base nitrogenada. Estos fragmentos se someten a electroforesis capilar en gel de forma que se separan las moléculas que difieren sólo un nucleótido de longitud a lo largo de una calle. La secuencia de las bases nitrogenadas se realiza electrónicamente hasta completar la secuencia.

Para generar los fragmentos de ADN que finalizan en una de las bases se utiliza el procedimiento dideoxi de Sanger, por el que se genera una copia de la cadena sencilla de ADN con dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3'. De esta forma, cuando uno de estos nucleótidos se incorporan a una cadena de ADN en crecimiento, ésta no puede continuar la elongación debido a que la cadena carece del grupo terminal 3'-OH necesario para poder añadir otro nucleótido.

Identificación de los microorganismos a partir de las secuencias

La identificación de los microorganismos presentes en las muestras se realizó a partir de las secuencias del ADN recuperado del contenido de las bandas. Las secuencias se introdujeron en la base de datos pública BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) donde se realizó el alineamiento de secuencias con el objetivo de identificar la cepa correspondiente a la secuencia obtenida en el análisis. Una vez obtenida esta información, los datos fueron tratados con el programa MEGA 6 desarrollado por Tamura *et al.* (2013).

4 DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE UNA MEZCLA BINARIA DE ETANOL Y 1-METOXI-2-PROPANOL

Parte de este capítulo se ha publicado en:

Lafita, C., Penya-roja, J.M., Gabaldón, C., 2015. Anaerobic degradation of 1-metoxi-2-propanol under ambient temperature in an EGSB reactor. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 38, 2137-2146.

Los éteres de glicol se utilizan frecuentemente como disolventes debido a su comportamiento anfifílico. Dentro de estos compuestos, debido a su nula toxicidad, se encuentra en creciente aumento el uso de 1-metoxi-2-propanol (Aydin *et al.*, 2010). En el sector flexográfico se utiliza la mezcla de este compuesto junto con etanol como retardante del secado de las tintas de impresión (European Commission, 2009), con un consumo anual en la Unión Europea aproximado de 12 kilo toneladas (European Commission, 2006).

Existen numerosos estudios previos sobre la degradación aerobia del 1-metoxi-2-propanol, pero únicamente hay una referencia bibliográfica sobre la degradación anaerobia de este compuesto. El estudio llevado a cabo por Goodwin en 1998 con reactores operados en discontinuo, utilizando como inóculo fango anaerobio procedente de una depuradora de aguas residuales urbanas, en el que se muestra la degradación del 38% del carbono orgánico disuelto tras 81 días de operación. Este autor también observó un periodo previo sin producción de biogás de 30 días.

Los procesos de degradación anaerobia a temperatura ambiente o psicrófilico (<20 °C) se han mostrado como una alternativa eficaz para el tratamiento de una gran variedad de aguas residuales, incluyendo aguas residuales contaminadas con diferentes disolventes (Enright *et al.*, 2005, 2007; Scully *et al.*, 2006), lo que hace que el tratamiento psicrófilico sea una opción atractiva para el tratamiento de aguas residuales industriales contaminadas con disolventes de la industria flexográfica.

El proceso de la puesta en marcha mediante un adecuado periodo de aclimatación de los bioreactores anaerobios operados a bajas temperaturas es crucial para que se realice de forma satisfactoria la degradación de los contaminantes (Dhaked *et al.*, 2010). Las bajas temperaturas causan un descenso en la tasa máxima de utilización de sustrato y en la tasa específica de crecimiento de los microorganismos, teniendo la temperatura un mayor efecto negativo sobre las comunidades de arqueas y de bacterias que la presencia de compuestos poco biodegradables (Siggins *et al.*, 2011). Los cambios de temperatura afectan principalmente a los microorganismos especializados como son los acetogénicos y los metanogénicos, por lo que la producción de biogás es dependiente de la temperatura, pudiéndose producir un descenso en la producción de éste por la incapacidad de los microorganismos mesofílicos a la supervivencia bajo condiciones psicrófilicas (Kashyap *et al.*, 2003), que causan el agotamiento de la energía celular, la pérdida de las sustancias intracelulares o la lisis de las células (Gounot, 1986). A pesar de esto, numerosos autores han logrado una producción de biogás

satisfactoria a bajas temperaturas, entre 15 y 20 °C tras la adaptación de la comunidad microbiana a las condiciones psicrófilas durante la puesta en marcha de los reactores (Zeeman *et al.*, 1988). De hecho, los procesos de degradación anaerobia en condiciones psicrófilas son llevados a cabo por microorganismos mesófilos psicrotolerantes (Kashyap *et al.*, 2003; Kettunen y Rintala, 1997).

El estudio que aquí se presenta se realizó en diferentes fases en dos reactores RALF operados bajo condiciones psicrófilas de 18 °C, RALF 1, y bajo condiciones mesófilas de 25 °C, RALF 2. En una primera fase (fase A) se realizó la puesta en marcha y adaptación de la biomasa a la temperatura de operación utilizando etanol como único sustrato. Esta fase se realizó en diferentes estadios en función de la velocidad de carga orgánica aplicada a los reactores anaerobios. A continuación se llevaron a cabo dos experimentos para la degradación de un agua residual que contenía una mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol con el fin de determinar el conjunto de parámetros de operación que permiten obtener elevadas eficacias de eliminación. En el primer ensayo con esta mezcla (fase B) se efectuaron variaciones en la carga orgánica del contaminante. Posteriormente, en el segundo ensayo, se realizó primero la puesta en marcha tras un periodo largo sin suministro de sustrato (fase C) y luego se realizó el suministro de sustrato en discontinuo con paradas nocturnas y de fin de semana en el aporte de influente (fase D).

En el capítulo 3, Materiales y Métodos, se describe el montaje experimental que se utilizó durante toda esta fase experimental, la composición de nutrientes del agua influente y las técnicas analíticas utilizadas. La biomasa utilizada como inóculo en los reactores RALF de laboratorio provino de un reactor de circulación interna de 786 m³ de volumen de la estación depuradora de aguas residuales industriales ubicada en la cervecera de Font Salem, El Puig (Valencia). Este reactor se opera en un intervalo de temperaturas comprendido entre 22 y 32 °C. La carga orgánica se ha calculado en base al volumen efectivo del reactor (4 litros).

4.1 PLAN DE TRABAJO

A continuación se describe el plan de trabajo seguido durante la puesta en marcha de los reactores RALF y en el estudio de la degradación anaerobia de una mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol bajo condiciones de suministro de sustrato en continuo e intermitente.

4.1.1 Puesta en marcha de los reactores RALF

Al inicio del estudio se planteó un ensayo de puesta en marcha de dos reactores RALF de laboratorio a dos temperaturas diferentes, 18 y 25 °C, con el fin de adecuar la biomasa utilizada como inóculo a las temperaturas de trabajo, utilizando como sustrato etanol. La estrategia empleada para la puesta en marcha consistió en la aplicación de cargas orgánicas crecientes mediante el aumento de la concentración de etanol en el alimento o el incremento del caudal de entrada (fases de la A-I hasta la A-VI). Se estableció que para el aumento en la velocidad de carga orgánica se debían registrar eficacias de eliminación (EE) superiores al 95 %. En la Tabla 4.1 se detallan las condiciones de operación seleccionadas en el diseño de los experimentos de puesta en marcha del reactor RALF 1, operado a 18 °C, y RALF 2, operado a 25 °C. La velocidad superficial aplicada (9.2 m h^{-1}) se encuentra dentro de las velocidades habituales para este tipo de reactores, con valores comprendidos entre 4 y 10 m h^{-1} (Lettinga et al., 2001), y se alcanzó mediante la aplicación de una caudal de recirculación de 30 l h^{-1} .

Tabla 4.1.- Condiciones de operación para la puesta en marcha de los reactores RALF utilizando etanol como sustrato.

	A-I	A-II	A-III	A-IV	A-V	A-VI
Condiciones psicofílicas (RALF 1) - 18 °C						
$v_s, \text{ m h}^{-1}$	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	-
$C_e, \text{ g DQO l}^{-1}$	8	8	8	10.7-15	12.5	-
$\text{CO}, \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	5	10	15	20	25	-
Condiciones mesofílicas (RALF 2) - 25 °C						
$v_s, \text{ m h}^{-1}$	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2
$C_e, \text{ g DQO l}^{-1}$	8	8	8	10.7-15	12.5	12.5
$\text{CO}, \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	10	15	20	25	30	35

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; CO: carga orgánica

4.1.2 Degradación anaerobia de una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol en condiciones mesofílicas y psicofílicas

El ensayo denominado fase B consistió en la aplicación de diferentes cargas orgánicas durante un periodo de 4 meses con el objetivo de determinar la carga orgánica de 1-metoxi-2-propanol que, en presencia de etanol, permite mantener elevadas eficacias de eliminación. Las condiciones experimentales aplicadas se detallan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Condiciones de operación aplicadas en los experimentos de degradación anaerobia de una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol.

	B-I	B-II	B-III	B-IV
Condiciones psicrófilicas (RALF 1) – 18 °C				
v_s , m h ⁻¹	9.2	12.7	12.7	12.7
C_e , g DQO l ⁻¹	12.5	15.5	15.5	15.5
C_e M2P, g DQO l ⁻¹	5	3.6	3.6	3.6
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	30	35	25	30
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	12	8.1	5.8	7
Condiciones mesófilicas (RALF 2) – 25 °C				
v_s , m h ⁻¹	9.2	12.7	12.7	12.7
C_e , g DQO l ⁻¹	12.5	15.5	15.5	15.5
C_e M2P, g DQO l ⁻¹	2.9	3.6	3.6	3.6
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	45	50	35	40
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	12	8.1	5.8	7

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; M2P: 1-metoxi-2-propanol; CO: carga orgánica

El experimento se dividió en 4 periodos diferentes (B-I a B-IV) en los que se modificó la carga orgánica y la relación másica de etanol y 1-metoxi-2-propanol. Con el objetivo de determinar la carga orgánica de 1-metoxi-2-propanol con la que se obtienen eficacias de eliminación superiores al 90% se aplicaron en ambos reactores diferentes cargas orgánicas, de forma que en los dos primeros periodos se utilizaron las mayores cargas orgánicas en ambos reactores, y en las dos últimas etapas las menores. La concentración de DQO en el influente en la etapa B-I fue de 12.5 g DQO l⁻¹, con una relación en masa de la mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol de 3:1. A partir de la etapa B-II se aumentó la concentración hasta 15.5 g DQO l⁻¹ y también se modificó la relación en masa de etanol y 1-metoxi-2-propanol a 4:1, habitual en la composición de las tintas utilizadas en el sector de la impresión flexográfica. También se aumentó el caudal de recirculación de 30 a 41.7 l h⁻¹ a fin de favorecer la expansión y fluidización del lecho de los reactores.

4.1.3 Evaluación de la respuesta del reactor RALF a una interrupción prolongada en el suministro de sustrato

En el ensayo denominado fase C se evaluó el rendimiento de los reactores anaerobios tras un periodo sin aporte de sustrato con el fin de evaluar la influencia que tiene sobre el proceso. Este ensayo tiene importancia para la posible

aplicación industrial. Para ello, se paralizó la operación de ambos reactores durante un mes.

Tras el mes sin funcionamiento, este experimento consistió en el aumento progresivo de la carga orgánica durante casi tres meses. Las condiciones experimentales aplicadas a ambos reactores se detallan en la Tabla 4.3. El experimento se dividió en 4 periodos diferentes en el caso del reactor RALF 1 y en 6 periodos en el caso del reactor RAFL 2, dependiendo de la carga orgánica aportada al sistema. En el reactor RALF 1 se aumentó la carga orgánica desde 15 kg DQO m⁻³ d⁻¹ hasta 30 kg DQO m⁻³ d⁻¹. En el caso del reactor RALF 2, operado a 25 °C, tras observar que el sistema no respondía bien a la puesta en marcha con una carga orgánica de 15 kg DQO m⁻³ d⁻¹, fue necesario un descenso de ésta hasta 5 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (fase C-III), para a partir de ahí continuar con un plan de trabajo similar al realizado en el RALF 1.

Tabla 4.3.- Condiciones de operación aplicadas tras una interrupción prolongada de la alimentación.

	C-I	C-II	C-III	C-IV	C-V	C-VI
Condiciones psicrófilas (RALF 1) – 18 °C						
v_s , m h ⁻¹	12.7	12.7	12.7	12.7	-	-
C_e , g DQO l ⁻¹	8	10	10	12	-	-
C_e M2P, g DQO l ⁻¹	1.9	2.3	2.3	2.8	-	-
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	15	20	25	30	-	-
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	3.6	4.6	5.8	7	-	-
Condiciones mesofílicas (RALF 2) – 25 °C						
v_s , m h ⁻¹	12.7	12.7	12.7	12.7	12.7	12.7
C_e , g DQO l ⁻¹	15	8	8	10	12	12
C_e M2P, g DQO l ⁻¹	3.5	1.9	1.9	2.3	2.8	2.8
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	15	5	15	20	25	30
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	3.5	1.2	3.6	4.6	5.8	7

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; M2P: 1-metoxi-2-propanol; CO: carga orgánica

4.1.4 Respuesta dinámica de los reactores RAFL al suministro cíclico del sustrato orgánico

La emisión de disolventes en la industria flexográfica sigue un patrón diario según los turnos de trabajo utilizados, que pueden ser de 1 a 3 dependiendo de las necesidades de producción. Es por ello que, para evaluar la viabilidad de este proceso es conveniente estudiar su funcionamiento bajo condiciones habituales a

nivel industrial. En el experimento D se seleccionó un patrón de emisión de fabricación correspondiente a una empresa flexográfica que trabaja a 2 turnos, con paradas diarias de 8 horas (turno de noche), con el fin de determinar el efecto que un suministro intermitente de sustrato tiene sobre la eficacia del proceso. También se realizaron paradas cíclicas en el aporte de sustrato de 56 horas semanales (de viernes por la noche a lunes por la mañana) con el fin de simular paradas de producción durante los fines de semana. Esta fase del estudio se realizó a continuación de la anterior y después de comprobar la estabilidad en ambos reactores bajo condiciones cíclicas de aporte de sustrato.

El experimento se dividió en 3 fases diferentes atendiendo al patrón de alimentación y carga orgánica aplicados. En la primera fase (D-I), se realizó un aporte de sustrato intermitente durante 16 horas al día, los 7 días de la semana, con el fin de simular paradas nocturnas del proceso de fabricación. Durante esta fase se aplicó a los reactores una carga orgánica de $30 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. A partir de la fase D-II se realizaron a su vez interrupciones en el aporte de sustrato durante los fines de semana, con lo que se alimentaron los reactores durante 16 horas al día, 5 días a la semana. Con este patrón de alimentación se utilizaron 2 cargas orgánicas diferentes, primero $30 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (fase D-II) y luego $35 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (fase D-III), con el fin de determinar la carga orgánica a aplicar bajo condiciones cíclicas de aporte y no aporte de sustrato sin comprometer la eficacia del proceso. Durante todo el experimento se mantuvo constante la recirculación en ambos reactores, mientras que el aporte de nutrientes se realizó de forma cíclica junto con la alimentación de sustrato orgánico.

Tabla 4.4.- Condiciones de operación aplicadas en los experimentos con aporte intermitente de sustrato.

	D-I	D-II	D-III
Condiciones psicofílicas (RALF 1) – 18 °C			
Patrón de alimentación	16 h d ⁻¹ , 7/7 d	16 h d ⁻¹ , 5/7 d	16 h d ⁻¹ , 5/7 d
v _s , m h ⁻¹	12.7	12.7	12.7
C _e , g DQO l ⁻¹	13	13	15
C _e M2P, g DQO l ⁻¹	3	3	3.5
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	30	30	35
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	6.9	6.9	8.1
Condiciones mesofílicas (RALF 2) – 25 °C			
Patrón de alimentación	16 h d ⁻¹ , 7/7 d	16 h d ⁻¹ , 5/7 d	16 h d ⁻¹ , 5/7 d
v _s , m h ⁻¹	12.7	12.7	12.7
C _e , g DQO l ⁻¹	13	13	15
C _e M2P, g DQO l ⁻¹	3	3	3.5
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	30	30	35
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	6.9	6.9	8.1

v_s: velocidad superficial; C_e: concentración influente; M2P: 1-metoxi-2-propanol; CO: carga orgánica

Durante esta fase de la experimentación y con el fin de determinar la respuesta dinámica de los reactores anaerobios con aporte intermitente de sustrato, se realizó una toma de muestras cada dos horas desde el inicio del suministro de sustrato hasta 10 horas después. En los periodos D-II y D-III, estos ensayos se realizaron en lunes (respuesta representativa del comportamiento tras el fin de semana sin alimentación) y los jueves (representativa de un ciclo diario sin suministro nocturno de sustrato). Junto con la toma de cada una de las muestras se llevaron a cabo un conjunto de ensayos intensivos. En estos ensayos se realizó el análisis de la concentración de DQO, carbono orgánico y ácidos grasos volátiles, así como de la producción de metano.

4.1.5 Estudio del potencial bioquímico de metano y la actividad metanogénica específica

Al finalizar los experimentos con los reactores RALF, se tomó biomasa de cada reactor con el fin de determinar el potencial de producción de metano con cada uno de los sustratos aplicados. Los ensayos se realizaron a 18 y 25 °C por triplicado en un sistema compuesto por reactores de 1 L, un baño termostático y un sistema de medición de la producción de metano llamado AMPTS (Bioprocess control, Suecia) con las condiciones que se indican en el apartado de Materiales y

métodos. El medio del ensayo consistió en un agua residual sintética compuesta por etanol o 1-metoxi-2-propanol en una concentración de 2.5 g DQO l⁻¹. A este agua residual se le añadieron 5 g NaHCO₃ l⁻¹ para mantener el pH en valores neutro y macro y micronutrientes en la concentración que se indica en la Tabla 3.6.

4.1.6 Evolución de las poblaciones microbianas

A lo largo de todo el experimento se recogieron muestras de biomasa de ambos reactores para realizar el estudio de la evolución de las poblaciones microbianas. Las muestras utilizadas para este análisis y las condiciones operacionales en las que fueron tomadas se detallan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5.- Muestras biológicas analizadas y condiciones de operación en las que fueron tomadas.

Nº de muestra	Día de operación	Origen muestra	Condiciones de operación
1	0	Fango siembra	-
2	90	RALF 1	Continuo (B-IV)
3	231	RALF 1	Disc 16h/7d (D-I)
4	263	RALF 1	Disc 16h/5d (D-III)
5	90	RALF 2	Continuo (B-IV)
6	231	RALF 2	Disc 16h/7d (D-I)
7	263	RALF 2	Disc 16h/5d (D-III)

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1 Puesta en marcha de los reactores RALF

Los resultados correspondientes al proceso de puesta en marcha de los 2 reactores RALF se muestran en la Tabla 4.6. Para la degradación de etanol en condiciones mesofílicas se puede destacar la elevada eficacia de eliminación global, superior al 98% durante todo el experimento, lo que permitió el aumento de la carga orgánica por encima de 25 kg DQO m⁻³ d⁻¹ tras 84 días de operación sin que se produjera la sobrecarga del reactor. La concentración media de DQO en el efluente durante la última fase fue similar a las concentraciones obtenidas en las fases anteriores. En relación a la degradación de etanol en condiciones psicofílicas, se obtuvieron concentraciones medias de salida superiores a 800 mg

DQO l⁻¹ en las dos últimas fases de la experimentación (A-IV y A-V), bajo cargas orgánicas de 20 y 25 kg DQO m⁻³ d⁻¹, siendo indicativo de un inicio de sobrecarga operando a 18 °C.

La presencia de elevadas concentraciones de CO₂ en el gas producido, normalmente en un intervalo entre un 30 y 50%, reduce la alcalinidad del agua residual, por lo que es necesario un aporte de alcalinidad para el control del pH. La concentración de alcalinidad se realizó según lo indicado por Tchobanoglous *et al.*, (2003). La relación entre el pH y la concentración de alcalinidad se controla por la química del bicarbonato según la siguiente ecuación:

$$\frac{[\text{HCO}_3^-][\text{H}^+]}{[\text{HCO}_3^-]} = k_{\text{alk}} \quad (4.1)$$

donde k_{alk} es la constante de disociación que depende de la fuerza iónica y de la temperatura.

Por otro lado, la concentración de ácido carbónico se determina según la ley de Henri y la presión parcial del CO₂ en la atmósfera con la que está en contacto el líquido, según la siguiente expresión:

$$\chi_g = \frac{P_T}{H} P_g \quad (4.2)$$

donde χ_g es la fracción molar del gas en el agua (mol gas mol⁻¹ agua), P_T es la presión total (normalmente 1 atm), H es la constante de la ley de Henri y P_g es la fracción molar de gas en el aire (mol gas mol⁻¹ aire).

A partir de estas expresiones, y teniendo en cuenta un porcentaje de CO₂ del 35% y una temperatura de 18 °C, se obtiene que para que el pH de ambos reactores se mantuviera en valores próximos a 7 era necesario la dosificación de alcalinidad en forma de bicarbonato sódico en una concentración de 5 g NaHCO₃ l⁻¹.

Tabla 4.6.- Experimento A. Resultados experimentales correspondientes a los reactores RALF durante la puesta en marcha utilizando etanol como único sustrato. Valores promedio y su desviación estándar.

	A-I	A-II	A-III	A-IV	A-V	A-VI
Condiciones psicrófilicas (RALF1) – 18 °C						
Días de operación	0-18	19-26	27-43	44-70	71-120	-
Temperatura, °C	17	n.d.	18.2±0.1	18.1±1.3	18.6±1.4	-
v_s , m h ⁻¹	9.1	9.1	9.1	9.1	9.2	-
C_e , mg DQO l ⁻¹	7353±318	9839	8369±2036	11234±1668	10061±2152	-
C_s , mg DQO l ⁻¹	425±556	142	365±144	806±482	884±691	-
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	5.7±0.3	12.8	15.7±3.8	19.3±2.7	24.9±5.3	-
EE global, %	94.1±7.9	98.6	95.3±2.5	92.9±4.1	91.7±5.4	-
pH	7±0.9	7.4	7.3±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	-
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	1274±1636	3550±298	3242±259	3204±280	3322±570	-
Condiciones mesofílicas (RALF 2) – 25 °C						
Días de operación	0-14	15-34	35-53	54-71	72-84	85-120
Temperatura, °C	26.2	n.d.	25.5±1.4	24.8±0.7	25.1±0.5	24.9±1.1
v_s , m h ⁻¹	9.1	9.1	15.5	15.5	15.5	15.5
C_e , mg DQO l ⁻¹	7437±1022	8571±1843	9310±2248	9789±2028	11830±1341	10106±2105
C_s , mg DQO l ⁻¹	83±11	78±40	184±98	152±19	141±31	180±72
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	9.3±1.3	16.1±3.5	23.3±5.6	25.6±4.3	29.3±3.3	33.7±8
EE global, %	98.9	99.1±0.4	98.1±0.6	98.4±0.4	98.8±0.3	98.2±0.5
pH	7±0.1	7.1±0.3	7.4±0.1	7.3	7.3±0.1	7.4±0.2
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	433±27	1496±1217	3579±205	3604±271	3358±261	3412±253

n.d.: no determinado; v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; C_s : concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación

En la Figura 4.1 se representan la variación temporal de la carga orgánica ($\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) y de la eficacia de eliminación (%) para el reactor RALF 1 (Figura 4.1a) y el reactor RALF 2 (Figura 4.1b). En la Figura 4.2 se incluye la variación temporal de la producción de biogás ($\text{m}^3 \text{ biogás kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$) y de la concentración de ácidos grasos volátiles ($\text{mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$) para el reactor RALF 1 (Figura 4.2a) y el reactor RALF 2 (Figura 4.2b). En la Figura 4.3 se muestra la concentración de sólidos suspendidos (mg SS l^{-1}) y el porcentaje de sólidos suspendidos volátiles (%) en el efluente del reactor RALF 1 (Figura 4.3a) y el reactor RALF 2 (Figura 4.3b).

En la Figura 4.1 se puede observar como desde los primeros días de operación la eficacia de eliminación obtenida en el reactor RALF 2 fue superior al 98%, indicando que desde el inicio de la experimentación la biomasa se encontraba adaptada tanto al sustrato utilizado, como a la temperatura de operación ($25\text{ }^\circ\text{C}$). A lo largo del tiempo que duró el experimento, la eficacia de eliminación se mantuvo en valores próximos al 100% para cargas orgánicas que variaron entre 10 y $30 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Los valores obtenidos para la degradación de etanol en condiciones mesofílicas de $25\text{ }^\circ\text{C}$ son parecidas a los obtenidos por otros autores; por ejemplo Kato *et al.* (1994) trataron una carga orgánica de $32.4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en un reactor RALF operado a $30\text{ }^\circ\text{C}$ y utilizando como sustrato etanol y ácidos grasos volátiles.

Con respecto a la operación del RALF 1, tras 6 días de operación se observaron eficacias de eliminación superiores al 98%. Un periodo similar, 10 días, fue observado por McKeown *et al.* (2009) para alcanzar una eficacia de eliminación superior al 85% con una carga orgánica de $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ de una mezcla de acetato, butirato, propionato y etanol con una relación en DQO de 1:1:1:1 en un reactor híbrido conformado por un reactor RAFL y un filtro anaerobio operado a $15\text{ }^\circ\text{C}$. Estas elevadas eficacias de eliminación se mantuvieron constantes durante los tres primeros periodos del experimento (del A-I al A-III), mostrando un buen rendimiento del sistema operado a $18\text{ }^\circ\text{C}$ con cargas orgánicas inferiores a $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. El cambio a una mayor carga orgánica aplicada realizado los días 44 y 71 causó una disminución en la eficacia de eliminación a valores inferiores al 90% y en ambos casos se necesitó un tiempo superior a 3 semanas para alcanzar eficacias de eliminación mayores. La carga orgánica degradada en el reactor operado bajo condiciones psicrófilicas al final de esta parte de la experimentación fue similar a la obtenida por Connaughton *et al.* (2006) que, utilizando un reactor RALF acoplado a un filtro anaerobio operado a $18\text{ }^\circ\text{C}$, determinó $24.6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ como carga orgánica máxima para el tratamiento de una mezcla de etanol, propionato, butirato y acetato en una relación en DQO 1:1:1:1.

Estos resultados muestran el descenso en la capacidad de degradación de un inóculo mesofílico durante su adaptación a la operación a bajas temperaturas, asociado a la disminución en la velocidad máxima de consumo de sustrato que se produce en condiciones psicrófilas (Lettinga *et al.*, 2001).

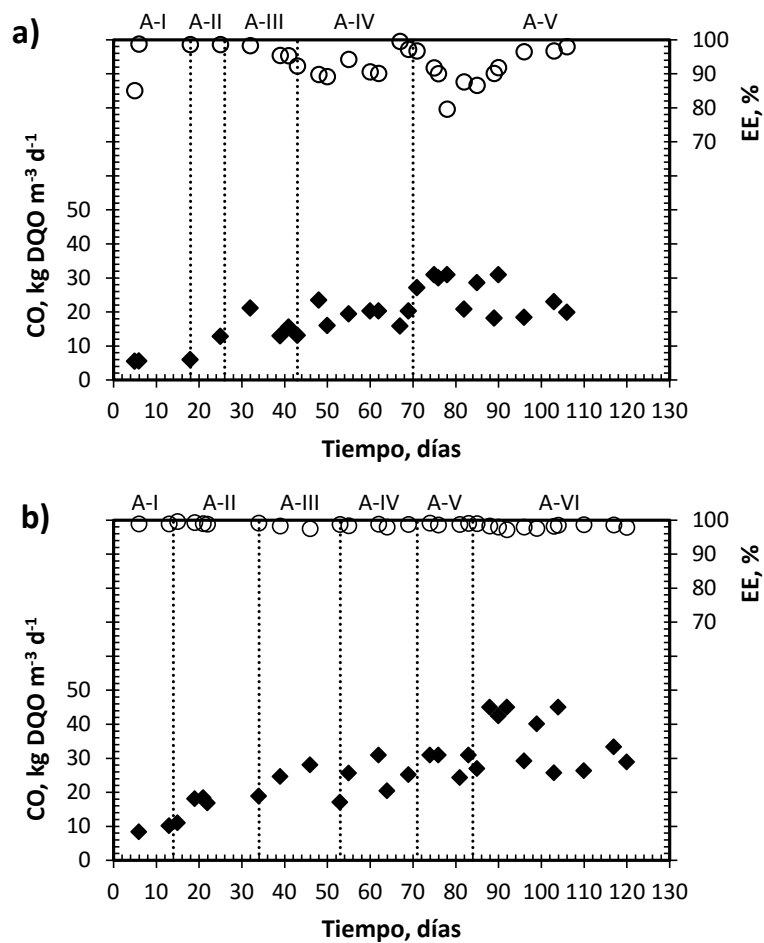


Figura 4.1.- Seguimiento de la variación temporal de: ♦ carga orgánica y ○ eficacia de eliminación en los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 durante la puesta en marcha con etanol como único sustrato.

En cuanto al seguimiento de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente y de la producción de metano (Figura 4.2), los resultados muestran que la adaptación del inóculo mesofílico a bajas temperaturas (RALF 1) resultó en un aumento inicial de la concentración de ácidos grasos volátiles durante los primeros

6 días de operación. Esto indica que los cambios de temperatura afectan particularmente a los microorganismos acetogénicos especializados y metanogénicos, pudiendo resultar en una inhibición de la metanogénesis (Rajeshwari *et al.*, 2000). A partir del día 8, se mantuvieron bajas concentraciones de ácidos grasos volátiles operando a bajas cargas orgánicas, pero a partir del día 40 se observó el incremento paulatino en la concentración de ácidos grasos volátiles con valores particularmente elevados ($>300 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$) al aplicar cargas orgánicas superiores a $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Esto indica que la fase metanogénica fue la etapa limitante que impidió la completa degradación de la materia orgánica. Los valores tan bajos obtenidos a partir del día 90 pueden indicar una lenta adaptación de la comunidad metanogénica a las condiciones psicofílicas. En el caso del reactor operado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, todos los valores de ácidos grasos volátiles se encuentran muy por debajo de $200 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$, indicando la adecuada adaptación del inóculo a la temperatura de trabajo.

La producción de biogás se mostró inestable durante las dos primeras fases de operación en ambos reactores, a pesar de la baja concentración de ácidos grasos volátiles. Esto podría ser debido al uso del agua de red con aporte elevado de sulfatos, potenciando el metabolismo de las bacterias sulfatoreductoras (Kalyuzhnyi *et al.*, 1997), aunque no afectó a la eliminación de la carga orgánica, ya que la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ se encontraba por encima de 10 g g^{-1} (Look W Hulshoff Pol *et al.*, 1998). A partir de la fase A-III se utilizó en parte agua desionizada, obteniendo así rendimientos más estables. Únicamente se observó un valor anormalmente bajo ($0.13 \text{ m}^3 \text{ biogás kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminado}}$) en el día 75 que coincidió con un pico en la acumulación de ácidos grasos volátiles. Este cambio en el aporte de sulfato se tradujo en una reducción de la concentración de ácido sulfhídrico en el biogás producido de valores comprendidos entre 250 y 800 ppm H_2S a valores comprendidos entre 20 y 50 ppm H_2S . Nuevas inestabilidades se observaron entre los días 70 y 90 en el reactor RALF 1 como muestra la elevada concentración de ácidos grasos volátiles. Las producciones de biogás que se alcanzaron durante las dos últimas fases en ambos reactores indican una potenciación de la actividad metanogénica, y por lo tanto una buena adaptación de la biomasa a las condiciones de operación (Kettunen y Rintala, 1997).

Estos resultados muestran que es factible el uso de biomasa de un reactor mesofílico como inóculo para el tratamiento de etanol en condiciones psicofílicas de $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Otros autores han observado una mejora en la actividad de los microorganismos tras su adaptación a bajas temperaturas. Por ejemplo, Rebac *et al.* (1995) obtuvieron un incremento entre 3 y 4 veces en la actividad de degradación de acetato tras la adaptación a condiciones psicofílicas de un fango

mesofílico a una temperatura de operación comprendida entre 10 y 12 °C en un reactor RALF utilizando como sustrato ácidos grasos volátiles tras 253 días de operación.

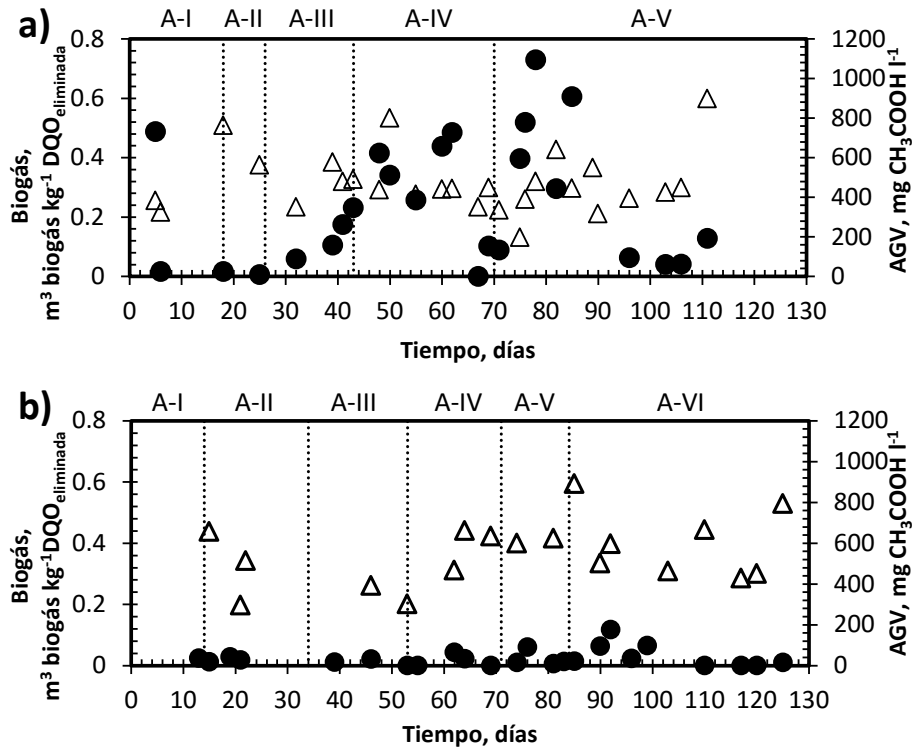


Figura 4.2.- Seguimiento de la evolución de: Δ la producción de biogás y \bullet la concentración de ácidos grasos volátiles en los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 durante la puesta en marcha con etanol como único sustrato.

En cuanto al seguimiento de la concentración de sólidos suspendidos en el efluente (Figura 4.3) se observa que en el reactor RALF 2 se produjo un aumento durante los primeros 20 días de operación y después se estabilizó en valores próximos a 100 mg SS l⁻¹. Por otro lado, en el reactor RALF 1 el aumento se produjo de forma progresiva hasta el día 80, en el que se estabilizó en valores comprendidos entre 120 y 140 mg SS l⁻¹, ligeramente más elevados que los del reactor RALF 2. En cualquier caso, los resultados en ambos reactores muestran la viabilidad del proceso con concentraciones muy bajas de sólidos suspendidos, lo

que demuestra la adecuada capacidad de retención de biomasa bajo las dos temperaturas ensayadas.

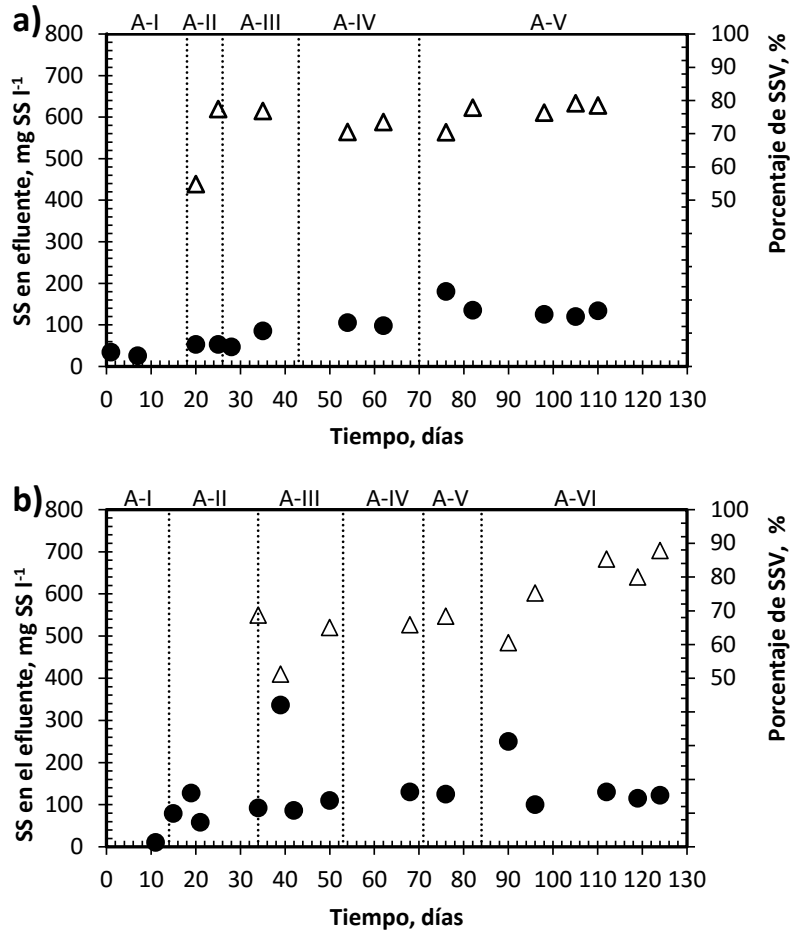


Figura 4.3.- Evolución de la ● concentración de sólidos suspendidos y del Δ porcentaje de sólidos suspendidos volátiles en el efluente de los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 durante la puesta en marcha con etanol como único sustrato.

4.2.2 Degradación anaerobia de una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol en condiciones mesofílicas y psicrófilicas

En la Tabla 4.7 se muestran los resultados correspondientes al estudio de la degradación de una mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol bajo

condiciones de aporte continuo de sustrato. Se puede destacar que el valor promedio de la eficacia de eliminación global obtenida fue superior al 73% en condiciones psicofílicas y al 78% en condiciones mesofílicas. En ambos reactores, durante las dos primeras etapas de la experimentación (B-I y B-II), se registraron elevadas concentraciones de materia orgánica en el efluente, superiores a 1400 mg DOQ l⁻¹, para cargas orgánicas comprendidas entre 32.6 y 37 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en el reactor RALF 1 y entre 45.5 y 55.4 kg DOQ m⁻³ d⁻¹ en el reactor RALF 2. En las etapas B-III y B-IV, tras el descenso de la carga orgánica entorno a un 35%, se produjo un aumento en la eficacia de eliminación en ambos reactores, alcanzando eficacias promedio superiores al 95% a 18 °C y al 97% a 25 °C. El descenso en la concentración de materia orgánica en el efluente se produjo de forma progresiva durante las tres primeras etapas de la experimentación hasta alcanzar un valor promedio de 612 mg DQO l⁻¹ en el reactor operado a 18 °C y de 285 mg DQO l⁻¹ en el reactor operado a 25 °C, respectivamente.

Con el objetivo de favorecer la fluidización del lecho granular, la velocidad superficial se aumentó en la etapa B-II en un 37% en ambos reactores hasta 12.7 m h⁻¹. A pesar de que autores como Rebac *et al.* (1995) han indicado que con la aplicación de elevadas velocidades superficiales se produce un aumento en la erosión del gránulo, no se observó durante la operación de los reactores ningún deterioro en la morfología granular de la biomasa.

Tabla 4.7.- Experimento B. Resultados experimentales correspondientes a la degradación anaerobia de una mezcla binaria compuesta por etanol y 1-metoxi-2-propanol con aporte continuo de sustrato. Valores promedio y su desviación estándar.

	B-I	B-II	B-III	B-IV
Condiciones psicrófilas (RALF 1) – 18 °C				
Días de operación	0-29	30-47	48-79	80-90
Temperatura, °C	18.8±0.5	19.4±0.6	18.6±0.4	18.5±0.2
v_s , m h ⁻¹	9.2	12.7	12.7	12.7
C_e , mg DQO l ⁻¹	13038±1321	14818±1633	13442±1354	13571±1700
C_s , mg DQO l ⁻¹	3387±510	2879±801	967±864	612±85
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	32.6±3.3	37±4.1	24.5±3	29.2±3.7
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	8.5±0.9	7.8±0.9	5.1±0.6	6.1±0.8
EE global, %	73.7±5	80.4±6	92.5±7.2	95.4±1.1
EE M2P, %	19.6±9.3	26.6±27.2	78.5±20.6	81.6±4.7
pH	7.3±0.1	7.3±0.2	7.2±0.2	7.2±0.2
Conductividad, mS cm ⁻¹	6.8±0.2	6.2±0.1	6.5±0.2	6.2±0.2
Potencial redox, mV	-387.7±7.9	-388.6±12.8	-386.9±5.9	-381.5±7.1
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	3599±78	3476±66	3559±104	3270±197
Condiciones mesófilas (RALF 2) – 25 °C				
Días de operación	0-29	30-47	48-79	80-90
Temperatura, °C	25.1±0.6	26.8±0.8	26.5±0.6	26.6±0.4
v_s , m h ⁻¹	14.3±2.8	12.7	12.7	12.7
C_e , mg DQO l ⁻¹	12646±1947	15393±1332	13345±1532	13547±1716
C_s , mg DQO l ⁻¹	2742±394	1482±857	422±455	285±173
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	45.5±7	55.4±4.8	35.5±4.4	42.7±5.4
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	12.5±1.4	11.6±1.0	7.5±0.9	9.0±1.1
EE global, %	78±3.9	90.1±5.9	96.6±4	97.9±1.3
EE M2P, %	21.6±10.5	53.2±28.3	84.3±19.2	91.6±5.3
pH	7.4±0.1	7.4±0.2	7.3±0.2	7.3±0.2
Conductividad, mS cm ⁻¹	6.8±0.2	6.4±0.2	6.4±0.6	6.3±0.1
Potencial redox, mV	-392.2±8.2	-394.3±5.2	-396.7±4	-392.6±4.1
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	3643±44	3588±78	3633±363	3465±79

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; C_s : concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación; M2P: 1-metoxi-2-propanol

En la Figura 4.4 se muestran la variación temporal de la carga orgánica total aplicada (kg DQO m⁻³ d⁻¹), la carga orgánica de 1-metoxi-2-propanol aplicada (kg DQO m⁻³ d⁻¹), la eficacia de eliminación global (%) y la eficacia de eliminación

de 1-metoxi-2-propanol (%) para el reactor RALF 1 (Figura 4.4a) y el reactor RALF 2 (Figura 4.4b).

La introducción de 1-metoxi-2-propanol en el alimento, junto con un aumento de la carga orgánica global, resultó en una disminución de la eficacia de eliminación (fase B-I); observándose en el día 14 una eficacia de eliminación global del 69% en condiciones psicrófilicas y del 76% en condiciones mesofílicas, con cargas orgánicas de 33 y 46 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente. Los análisis de cromatografía realizados al efluente de ambos reactores durante la primera fase del experimento mostraron que los reactores eran capaces de degradar por completo el etanol y únicamente un pequeño porcentaje de 1-metoxi-2-propanol alimentado. La eficacia de eliminación de 1-metoxi-2-propanol tras 23 días de operación fue baja y similar en ambos reactores, del 30% en el reactor operado a 18 °C y del 34% en el reactor operado a 25 °C.

Tras un periodo de adaptación al 1-metoxi-2-propanol de 44 y 34 días en el reactor operado a 18 °C y a 25 °C respectivamente, aumentaron las eficacias de eliminación del 1-metoxi-2-propanol, alcanzando valores superiores al 50%, mostrando el efecto adverso de las bajas temperaturas en la adaptación de los microorganismos a la degradación anaerobia de compuestos poco biodegradables. La adaptación de los microorganismos al uso de 1-metoxi-2-propanol como sustrato se produjo durante la fase B-III, tras la reducción de la carga orgánica en ambos reactores, obteniendo eficacias de eliminación de 1-metoxi-2-propanol superiores al 73% en el reactor psicrófilico y al 90% en el reactor mesofílico a partir del día 72. Los resultados de la fase B-IV indican que las cargas orgánicas de 1-metoxi-2-propanol que se pueden tratar en los reactores anaerobios son de 9 kg DQO m⁻³ d⁻¹ a 25 °C y de 6.1 kg DQO m⁻³ d⁻¹ a 18 °C. La influencia adversa de las bajas temperaturas sobre la degradación del etanol y del 1-metoxi-2-propanol fueron similares, siendo la máxima carga orgánica total aplicada en condiciones psicrófilicas un tercio inferior a la aplicada en condiciones mesofílicas.

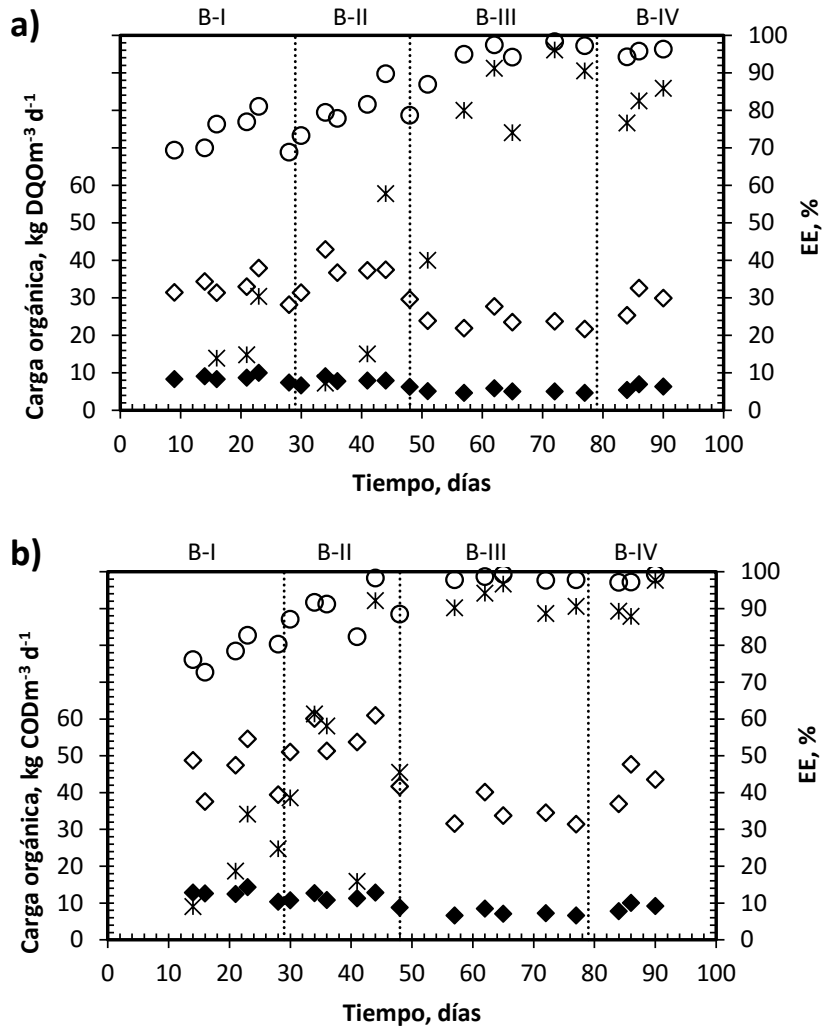


Figura 4.4.- Seguimiento de la variación temporal de: \diamond carga orgánica total, \blacklozenge carga orgánica del 1-metoxi-2-propanol, \circ eficacia de eliminación total y \ast eficacia de eliminación de 1-metoxi-2-propanol. a) reactor RALF 1, b) reactor RALF 2 con aporte continuo de sustrato.

En la Figura 4.5 se muestra la variación a largo del experimento B de la concentración en el efluente de 1-metoxi-2-propanol (mg DQO l⁻¹). La baja degradación del 1-metoxi-2-propanol al comienzo de este estudio provocó su acumulación hasta alcanzar concentraciones de 4000 mg DQO l⁻¹ en el reactor a 18 °C y 3200 mg DQO l⁻¹ en el reactor a 25 °C tras 10 días de operación. La adaptación gradual de los microorganismos a la degradación de 1-metoxi-2-propanol resultó en la disminución progresiva de la concentración de 1-metoxi-2-propanol en el efluente de ambos reactores hasta alcanzar una concentración estable e inferior a 744 mg DQO l⁻¹ en el reactor operado a 18 °C e inferior a 330 mg DQO l⁻¹ en el reactor operado a 25 °C a partir del día 57. Otros autores han descrito la necesidad de periodos de adaptación previos a la degradación de disolventes orgánicos. Por ejemplo, Scully *et al.* (2006) indicaron que fueron necesarios 26 días para comenzar a degradar fenol en un reactor anaerobio operado a 15 °C. Este largo periodo de tiempo para conseguir degradaciones elevadas de 1-metoxi-2-propanol, casi 2 meses, indica que los microorganismos anaerobios son capaces de producir lentamente las enzimas necesarias para la ruptura del enlace éter durante la metabolización de un sustrato tan fácilmente degradable como el etanol.

A pesar de que todavía no se han caracterizado las enzimas encargadas de la degradación de 1-metoxi-2-propanol, en la bibliografía se indica que, generalmente, el mecanismo necesario para realizar la ruptura del enlace éter de compuestos de éter glicólico, como polietilenglicol, incluye el intercambio entre un hidrógeno y un grupo hidroxilo entre dos átomos de carbono contiguos (transhidroxilación), lo que a su vez da lugar a un intermedio orgánico muy inestable que posee dos grupos hidroxilo (diol geminal) (Speranza *et al.*, 2002) y que colapsa rápidamente para dar aldehído. Estos compuestos se metabolizan de acuerdo a las rutas metabólicas principales. Entre las hipótesis se baraja el papel del cofactor B₁₂ como catalizador de la reacción de transhidroxilación de los éter glicólico, tal y como se ha observado en la reacción de conversión del succinil-CoA a metilmalonil-CoA o en el metabolismo de los aminoácidos (Nakano y Zuber, 2004).

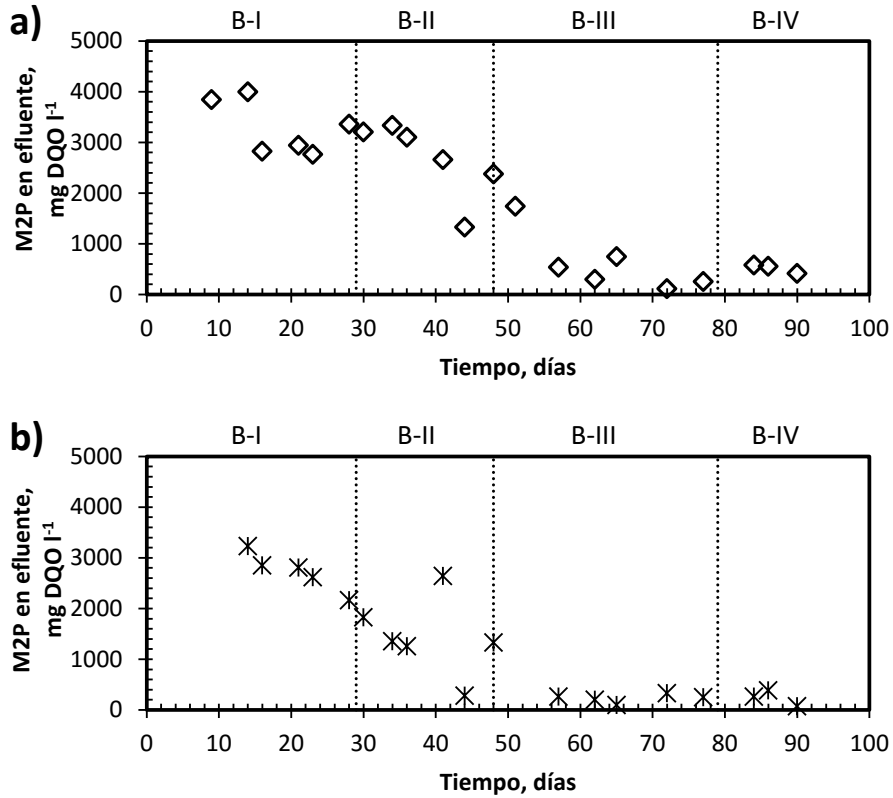


Figura 4.5.- Variación temporal de la concentración de 1-metoxi-2-propanol (M2P) en el efluente para los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 con aporte continuo de sustrato (mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol).

El mecanismo iniciado por la transhidroxilación del grupo hidroxilo también ha sido observado durante la degradación anaerobia de polietilenglicol. Según la hipótesis de Kawai (2002), los mecanismos intracelulares utilizados para la degradación de polipropilenglicol se basan en estos procesos de transhidroxilación. Aunque el establecimiento de mecanismos y rutas enzimáticas de la degradación de 1-metoxi-2-propanol está fuera del alcance de esta tesis doctoral, se puede formular una hipótesis en cuanto a la vía de degradación por analogía con los mecanismos descritos en la bibliografía. Una posible hipótesis se muestra en la Figura 4.6. En cualquier caso, la etapa limitante es la reacción de transhidroxilación, ya que no se han detectado metabolitos mediante cromatografía gaseosa, indicando la importancia de identificar las rutas enzimáticas a fin de optimizar su velocidad.

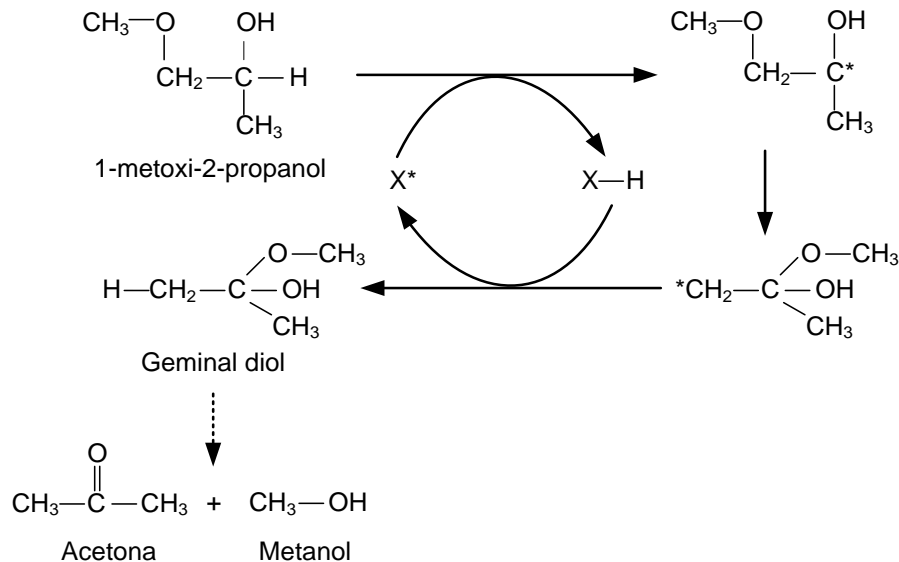


Figura 4.6.- Hipótesis sobre posibles mecanismos para la degradación anaerobia de 1-metoxi-2-propanol.

La evolución temporal de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente ($\text{mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$) y de la producción de metano (m^3 metano kg^{-1} $\text{DQO}_{\text{eliminada}}$) para los dos reactores se muestran en la Figura 4.7. La concentración en el efluente de ácidos grasos volátiles fue mayor en el reactor operado a 18°C , mostrando una menor actividad de los microorganismos metanogénicos en condiciones psicrófilas. En este reactor, la metanogénesis fue la etapa limitante tras la adaptación de los microorganismos a la degradación del 1-metoxi-2-propanol, observándose un pequeño incremento de la concentración de ácidos grasos volátiles durante las dos primeras etapas (B-I y B-II), hasta alcanzar concentraciones de $198 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$. Collins *et al.* (2003) observó concentraciones de ácidos grasos volátiles de hasta 1600 mg l^{-1} trabajando con un reactor RALF a 18°C , con una concentración de 10 g DQO l^{-1} (mezcla de etanol, butirato, propionato y acetato con una relación en DQO 1:1:1:1). En las dos últimas etapas (B-III y B-IV), la concentración de ácidos grasos volátiles se redujo y se mantuvo en valores comprendidos entre 50 y $140 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$. En el reactor RALF 2 se obtuvo una mayor estabilidad del proceso de degradación anaerobia, tal y como muestra la baja concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente, inferior a $73 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$ durante todo el experimento. La producción de metano en ambos reactores fue bastante estable, con valores similares en ambos e inferiores al estequiométrico, como es habitual en reactores de flujo abierto. La mayor actividad a 25°C de los microorganismos metanogénicos sugiere que no se

desarrolló en los más de 7 meses de operación, incluyendo la puesta en marcha, una población suficiente de microorganismos psicrófilicos, sino que los microorganismos mesófilicos del inóculo se adaptaron a 18 °C.

Estos resultados muestran que los reactores anaerobios de alta carga tipo RALF son una tecnología adecuada para la depuración de 1-metoxi-2-propanol, disolvente industrial, en presencia de etanol y con aporte continuo de sustrato y bajo condiciones mesofílicas subóptimas y psicrófilicas.

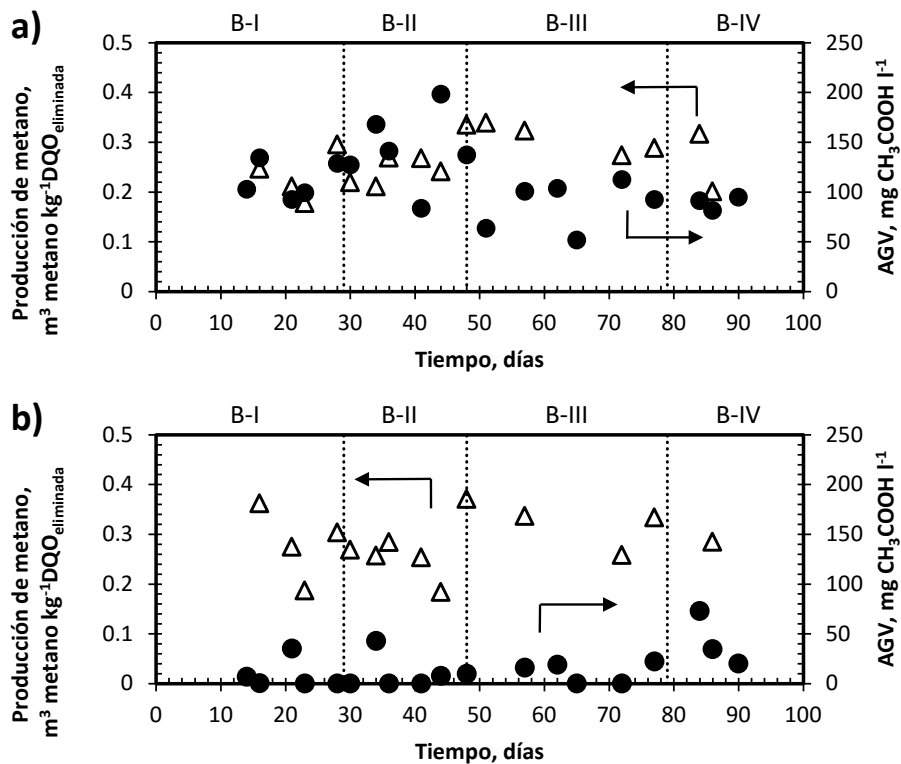


Figura 4.7.- Seguimiento de la evolución de: Δ la producción de biogás y \bullet la concentración de ácidos grasos volátiles en los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 con aporte continuo de sustrato (mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol).

4.2.3 Evaluación de la respuesta del reactor RALF a una interrupción prolongada en el suministro de sustrato

La Tabla 4.8 recoge los resultados de la puesta en marcha de los reactores tras mantenerlos sin aporte de sustrato durante 1 mes (días 91 a 119). Tras el

reestablecimiento de la alimentación y de la recirculación en ambos reactores en el día 120, se observó un descenso en la eficacia de eliminación global (fases C-III y C-IV) respecto a la obtenida al final de la operación en continuo, debido a que los microorganismos eran capaces de degradar etanol, pero muy poco 1-metoxi-2-propanol. Al final de este estudio la capacidad de degradación del 1-metoxi-2-propanol por parte de la biomasa anaerobia se reestableció, mostrando que los periodos sin aporte de sustrato de un mes producen la pérdida de la actividad enzimática necesaria para la degradación anaerobia de 1-metoxi-2-propanol. Este hecho sugiere que en la aplicación industrial de esta tecnología con el fin de degradar este disolvente es recomendable no cambiar la composición de las tintas utilizadas, con el objeto de asegurar la presencia de este disolvente en el agua residual y así mantener la biomasa del reactor expuesta a este disolvente de forma continua.

Tabla 4.8.- Experimento C. Resultados experimentales correspondientes a la reanudación de la operación tras 30 días de interrupción en el suministro de sustrato. Valores promedio y su desviación estándar.

	C-I	C-II	C-III	C-IV	C-V	C-VI
Condiciones psicrófilas (RALF1) – 18 °C						
Días de operación	120-149	150-163	164-177	178-204	-	-
Temperatura, °C	18.6±0.5	18.8±0.4	18.5±0.5	18.2±1.1	-	-
v_s , m h ⁻¹	12.7	12.7	12.7	12.7	-	-
C_e , mg DQO l ⁻¹	8586±965	11286±533	11797±1824	12477±985	-	-
C_s , mg DQO l ⁻¹	1614±834	1455±361	663±356	298±401	-	-
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	16.5±1.9	21.7±1.0	29.5±4.6	31.2±2.5	-	-
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	3.6±0.5	5.6±1.4	6.3±0.9	6.5±0.5	-	-
EE global, %	79.1±8.8	87.1±3.2	94.4±2.9	97.7±3.1	-	-
EE M2P, %	15.1±14.9	63.2±25.5	73.5±10.2	95.5±2.2	-	-
pH	7.4±0.1	7.3±0.1	7.2±0	7.1±0.1	-	-
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	3751±272	3418±69	3257±101	2948±198	-	-
Condiciones mesófilas (RALF 2) – 25 °C						
Días de operación	120-127	128-155	156-162	163-172	173-186	187-204
Temperatura, °C	26.1±1.0	25.7±1.4	25.5±1.1	25.8±0.9	27.2±0.6	25.9±1.3
v_s , m h ⁻¹	12.6	12.6	12.7	12.7	12.7	12.7
C_e , mg DQO l ⁻¹	10080±6740	8653±1800	8151±104	11353	12726±515	13591±21
C_s , mg DQO l ⁻¹	2295±1445	905±904	540±451	129±91	358±507	171±91
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	13.4±1.3	5.6±2.2	15.3±0.2	20.2±1.3	25.8±1.0	34.0±0.1
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	2.8±0.3	1.2±0.5	3.2±0	4.2±0.3	5.4±0.2	7.1±0
EE global, %	78.5±5.3	90.4±9.3	93.4±5.5	98.9±0.8	97.1±4.0	98.7±0.7
EE M2P, %	20.3±6.8	78.4±23.1	89.7±9.0	85.9±18.7	98.2±1.4	75.7±23.3
pH	7.6±0.4	7.5±0.1	7.3±0.1	7.2±0.1	7.2±0.0	7.3±0.2
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	2248±886	3670±400	3178±245	2911±237	2977±68	2916±70

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; C_s : concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación; M2P: 1-metoxi-2-propanol

En la Figura 4.8 se presentan la variación temporal de la carga orgánica total y de 1-metoxi-2-propanol ($\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), de la eficacia de eliminación total y la eficacia de eliminación de 1-metoxi-2-propanol (%) para ambos reactores. En la Figura 4.9 se muestra la variación temporal de la concentración de 1-metoxi-2-propanol en el efluente (mg DQO l^{-1}) de ambos reactores. En la Figura 4.10 se recogen los datos de la variación temporal de la concentración de ácidos grasos volátiles ($\text{mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$) y de la producción de metano ($\text{m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminado}}$) para ambos reactores.

En la Figura 4.8 se puede observar cómo, tras la reanudación del aporte de sustrato en los reactores anaerobios, el tiempo necesario para readaptar la biomasa y alcanzar eficacias de eliminación de 1-metoxi-2-propanol superiores al 95% fue de 24 días en el reactor operado a 25 °C y de 50 días en el reactor operado a 18 °C. Este tiempo fue ligeramente inferior en condiciones mesofílicas y similar en condiciones psicofílicas al necesario para la adaptación de los microorganismos cuando fueron expuestos al 1-metoxi-2-propanol por primera vez. En cualquier caso, se observa un periodo de latencia muy elevado que indica que la interrupción de 1 mes en el aporte de este disolvente provoca la pérdida de las enzimas necesarias para la ruptura del enlace éter y la capacidad para su producción. De hecho, en el reactor operado a 25 °C se tuvo que reducir la carga orgánica de $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ a $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ durante los primeros días de operación con el objetivo de estabilizar su operación. Tras 23 días a una carga de $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, el reactor pudo metabolizar de nuevo una carga orgánica de $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, con eficacias de eliminación superiores al 90%. Al final de la operación se alcanzaron eficacias de eliminación de 1-metoxi-2-propanol superiores al 95% con una carga orgánica de 1-metoxi-2-propanol de $7.1 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el reactor operado bajo condiciones psicofílicas y de $7.4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el reactor operado bajo condiciones mesofílicas, demostrando la recuperación del proceso biológico.

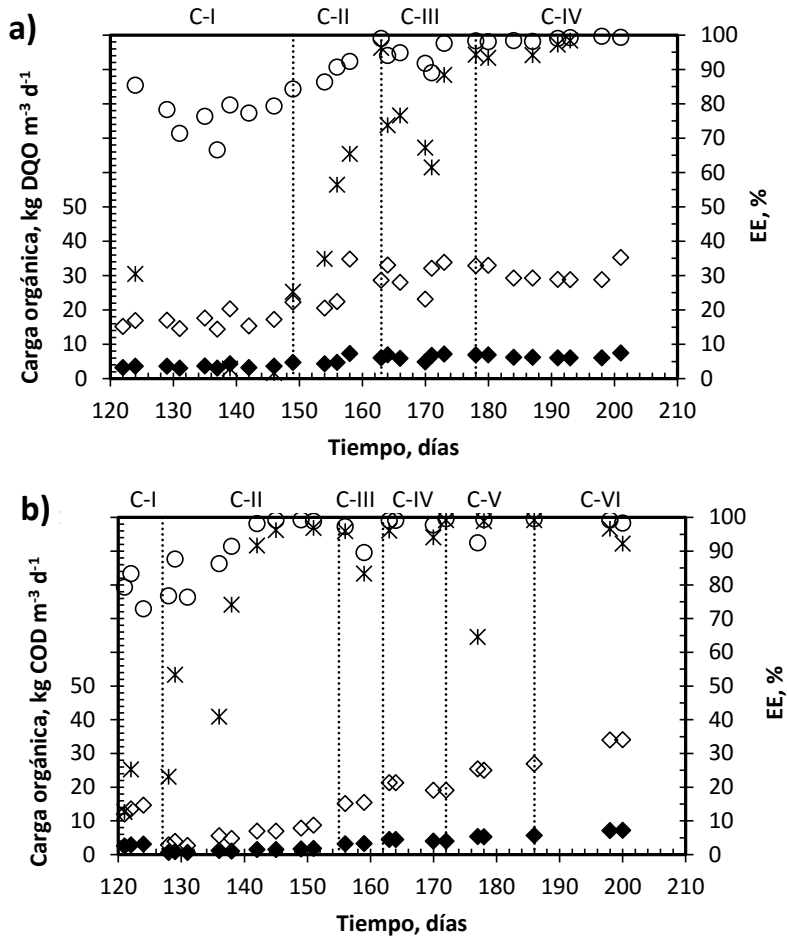


Figura 4.8.- Seguimiento de la variación temporal de: \diamond carga orgánica total, \blacklozenge carga orgánica del 1-metoxi-2-propanol, \circ eficacia de eliminación total y \ast eficacia de eliminación de 1-metoxi-2-propanol, para los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 al reanudar el experimento tras 30 días sin aporte de sustrato.

La variación temporal de la concentración de 1-metoxi-2-propanol en el efluente, Figura 4.9, presenta una tendencia diferente en cada uno de los reactores. En el reactor operado a 18 °C se produjo la acumulación de 1-metoxi-2-propanol durante los primeros 16 días de operación y luego, asociado a la adaptación de la biomasa, se produjo la reducción progresiva de la concentración de este disolvente en el efluente. Por el contrario, en el reactor operado a 25 °C, debido a las menores cargas orgánicas aplicadas al reactor, la acumulación de 1-

metoxi-2-propanol se produjo únicamente durante los primeros 7 días de operación, seguido de un descenso a valores inferiores a 500 mg DQO l⁻¹. Esto demuestra que la utilización de bajas cargas orgánicas tras paradas prolongadas del reactor puede tener un efecto positivo en la readaptación de los microorganismos; en cualquier caso, para la degradación de disolventes como 1-metoxi-2-propanol, la falta de exposición al sustrato durante un tiempo prolongado lleva asociado tiempos prolongados de reaclimatación al operar a temperatura ambiente.

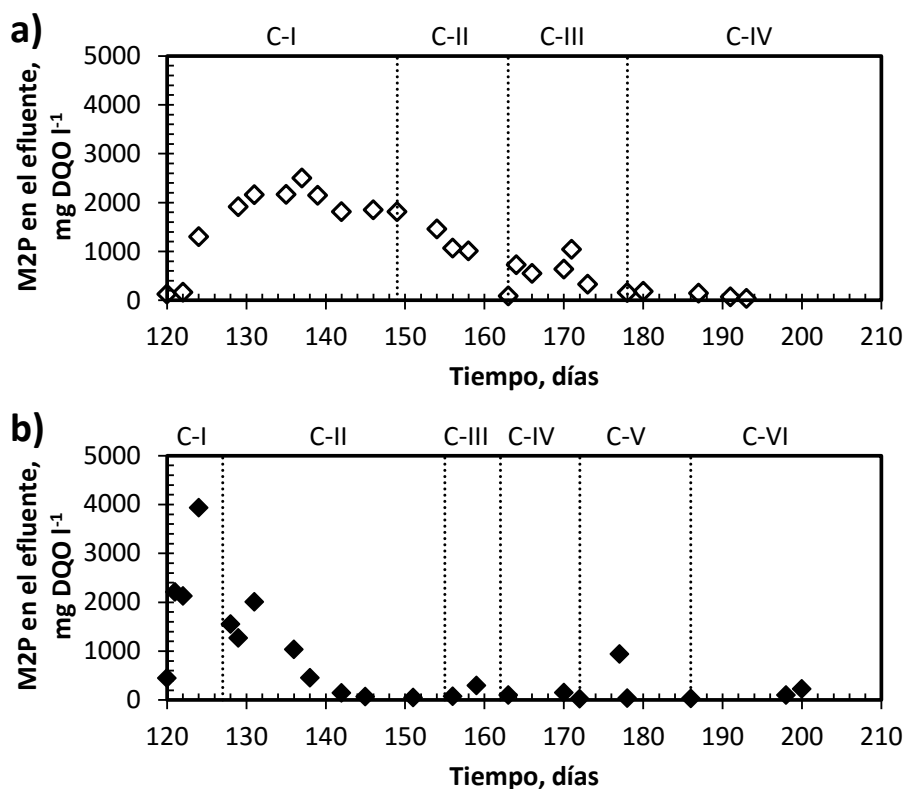


Figura 4.9.- Variación temporal de la concentración de 1-metoxi-2-propanol en el efluente para los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 durante la reanudación de la operación tras 30 días sin aporte de sustrato.

En la Figura 4.10 se observa que, tras la reintroducción del sustrato en el reactor operado bajo condiciones mesofílicas (fase C-I), se produjo una inestabilidad asociada a la acumulación de ácidos grasos volátiles con una producción de metano próxima a 0 m³ metano kg⁻¹ DQO_{eliminada}, lo que indica una baja actividad o incluso la inactividad de los microorganismos productores de

metano. Estos resultados indican que los microorganismos acetotrofos que conforman la sintrofia en la degradación anaerobia del etanol no conservaron su actividad tras un periodo sin aporte de sustrato al reactor. Para la recuperación parcial de la actividad de estos microorganismos fue necesaria la disminución de la carga orgánica durante 13 días. Al final del ensayo, la producción de metano siguió siendo superior en el reactor psicrófilico a pesar de la menor temperatura de operación a la que se encontraban expuestos los microorganismos. En cualquier caso, para ambos reactores fue inferior (valores promedio de $0.218 \pm 0.016 \text{ m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$ a 18°C y $0.143 \pm 0.016 \text{ m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$ a 25°C) a la obtenida antes de la interrupción del aporte de sustrato. Esto parece indicar un cierto desequilibrio en la comunidad microbiana de los reactores causada por la interrupción prolongada del aporte de sustrato.

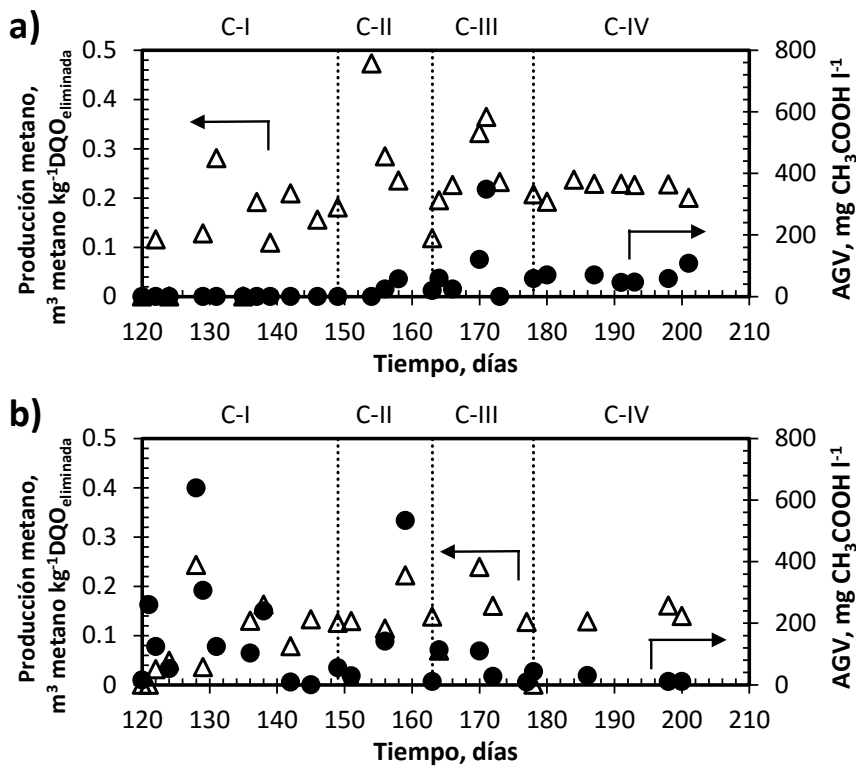


Figura 4.10.- Seguimiento de la evolución de: Δ la producción de biogás y \bullet la concentración de ácidos grasos volátiles para los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 durante la reanudación de la operación tras 30 días sin aporte de sustrato.

4.2.4 Respuesta dinámica de los reactores RALF al suministro cíclico del sustrato orgánico

En la Tabla 4.9 se muestran los resultados correspondientes a la operación de los reactores bajo aporte intermitente de una mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol. La fase D-I consistió en la interrupción del aporte de disolvente durante las noches y, en las fases D-II y D-III, se interrumpió el aporte también durante los fines de semana. Estos datos se corresponden con los valores promedio correspondientes a los análisis realizados 2 veces por semana después de 4 horas de funcionamiento tras la reanudación diaria del aporte de sustrato, a fin de representar la respuesta pseudo-estacionaria de cada día. Durante la aplicación de una carga orgánica de $30 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, fases D-I y D-II, se observó una operación estable en ambos reactores, con eficacias de eliminación de 1-metoxi-2-propanol promedio superiores al 97% y una concentración de DQO en el efluente menor a $340 \text{ mg DQO l}^{-1}$ en el reactor psicofílico y a $266 \text{ mg DQO l}^{-1}$ en el mesofílico. Estos valores son similares a los obtenidos con el aporte de sustrato en continuo cuando se les aplicó una carga orgánica de $30 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (fase B-IV). Nadais *et al.* (2005) también observaron, en un reactor RAFA operado a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ que trataba un agua residual proveniente de la industria láctea, que la operación intermitente con ciclos de 96 horas (48 horas alimentando, seguido de 48 horas sin alimentación) resultó en una eficacia de funcionamiento similar a la obtenida con la operación en continuo con una carga orgánica de $14 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Tabla 4.9.- Experimento D. Resultados correspondientes a la degradación anaerobia de una mezcla binaria compuesta por etanol y 1-metoxi-2-propanol con aporte intermitente de sustrato. Valores promedio y su desviación estándar.

	D-I	D-II	D-III
Condiciones psicrófilas (RALF 1) – 18 °C			
Días de operación	205-231	232-241	242-263
Temperatura, °C	19.4±0.5	20.6±0.4	20.2±1.0
v_s , m h ⁻¹	12.7	12.7	12.7
C_e , mg DQO l ⁻¹	12331±1012	12827±2131	14969±2233
C_s , mg DQO l ⁻¹	256±133	335±148	332±179
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	29.4±2.3	30.5±5.0	35.7±5.4
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	6.3±0.5	6.5±1.1	7.6±1.1
EE global, %	97.9±1.1	97.4±1.0	97.8±1.2
EE M2P, %	93.1±5.0	90.4±5.5	90.9±6.0
pH	7.1±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	5.6±0.1	5.6±0.1	5.6±0.1
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	2909±199	2999±49	2588±460
Condiciones mesófilas (RALF 2) – 25 °C			
Días de operación	205-231	232-241	242-263
Temperatura, °C	25.4±0.6	26.1±0.5	25.5±1.2
v_s , m h ⁻¹	12.7	12.7	12.7
C_e , mg DQO l ⁻¹	12535±857	13247±1905	14850±2100
C_s , mg DQO l ⁻¹	266±302	81±12	147±42
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	28.5±7	32±4.8	35.9±4.4
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	6.0±0.9	6.7±1.0	7.5±1.1
EE global, %	97.9±2.4	99.4±0.2	99.0±0.4
EE M2P, %	90.7±11.9	98.3±0.8	96.7±2.2
pH	7.2±0.1	7.3±0.1	7.3±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	5.6±0.1	5.7±0.1	5.5±0.2
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	2940±99	2988±52	2869±160

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; C_s : concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación; M2P: 1-metoxi-2-propanol

En la Figura 4.11 se presenta la variación temporal de: la carga orgánica total aplicada ($\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), la carga orgánica de 1-metoxi-2-propanol aplicada ($\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), la eficacia de eliminación global (%) y la eficacia de eliminación de 1-metoxi-2-propanol (%) para el reactor RALF 1 (Figura 4.11a) y el reactor RALF 2 (Figura 4.11b). Los resultados en ambos reactores fueron similares durante los periodos en los se les aplicó una carga orgánica de $30 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, observándose la completa degradación del etanol y una eliminación de 1-metoxi-2-propanol comprendida entre el 84 y el 97% para cargas orgánicas aplicadas comprendidas entre 5.5 y $6.4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Esto indica que las interrupciones en el aporte de sustrato asociadas a las paradas nocturnas o de fin de semana no afectan de forma negativa a la degradación de esta mezcla binaria de disolventes. A pesar de que tras el aumento de la carga orgánica a $35 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en ambos reactores (día 242) se observaron eficacias de eliminación de 1-metoxi-2-propanol elevadas, la operación intermitente con esta carga produjo la desintegración del gránulo, mostrando el cambio de una morfología esférica con buena sedimentación a una floculada. Por tanto, la máxima carga orgánica aplicada a los reactores anaerobios para obtener una eficacia de eliminación elevada fue un 30% inferior a la conseguida en el reactor operado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con aporte continuo de sustrato, mientras que en el reactor operado a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ se mantuvo la misma carga orgánica. Estos resultados demuestran que la operación de los reactores RALF bajo condiciones de alimentación cíclica intermitente puede influir negativamente en la degradación de elevadas cargas orgánicas de disolventes, indicando la importancia de evaluar el impacto sobre el proceso del patrón de producción del influente a depurar.

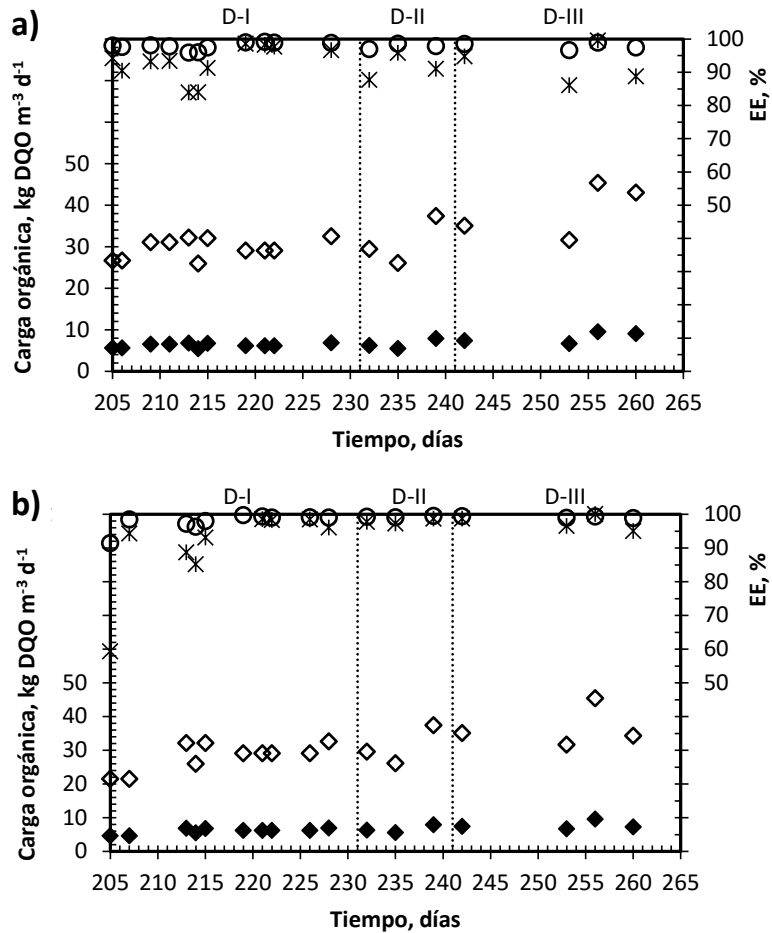


Figura 4.11.- Seguimiento de la variación temporal de: \diamond carga orgánica total, \blacklozenge carga orgánica de 1-metoxi-2-propanol, \circ eficacia de eliminación total y \ast eficacia de eliminación de 1-metoxi-2-propanol para los reactores a) RALF 1 y b) RALF 2 con aporte intermitente de sustrato (mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol).

En la Figura 4.12 se presenta la variación a largo del experimento de la concentración de 1-metoxi-2-propanol en el efluente (mg DQO l^{-1}) (Figura 4.12a), la producción de metano ($\text{m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$) (Figura 4.12b) y de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente ($\text{mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$) (Figura 4.12c) para los dos reactores RAFL.

La operación con interrupción cíclica diaria del aporte de sustrato no afectó a la capacidad de degradación de 1-metoxi-2-propanol, observándose bajas

concentraciones de este disolvente en el efluente de ambos reactores. En cuanto a la producción de metano, se mantuvo en valores próximos al estequiométrico en el reactor operado a 18 °C. La producción óptima de metano obtenida a 18 °C con aporte intermitente de sustrato en comparación con el aporte continuo también ha sido observada por otros autores. Así, Nadais *et al.* (2006) registró un aumento de la producción de metano a partir de la DQO degradada entre el 65 al 85% con alimentación intermitente frente a un aumento del 64% para un reactor operado en continuo al depurar aguas residuales del sector lácteo. En cambio, para el reactor operado a 25 °C, los bajos valores de producción específica de metano ($0.173 \pm 0.063 \text{ m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$) indican que el reactor no pudo recuperar el equilibrio de la población anaerobia del daño causado tras 30 días sin aporte de sustrato, ni tan siquiera después de 30 días de operación adicional. En la Figura 4.12c se muestra como el aumento de la carga orgánica a $35 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (periodo D-III) causó la acumulación de ácidos grasos volátiles, lo que indica que existe un cierto desequilibrio en la ecología microbiana encargada de la formación del gránulo. Estos resultados muestran que la concentración de ácidos grasos volátiles en el interior del reactor se puede utilizar como parámetro de control indirecto para la operación del proceso.

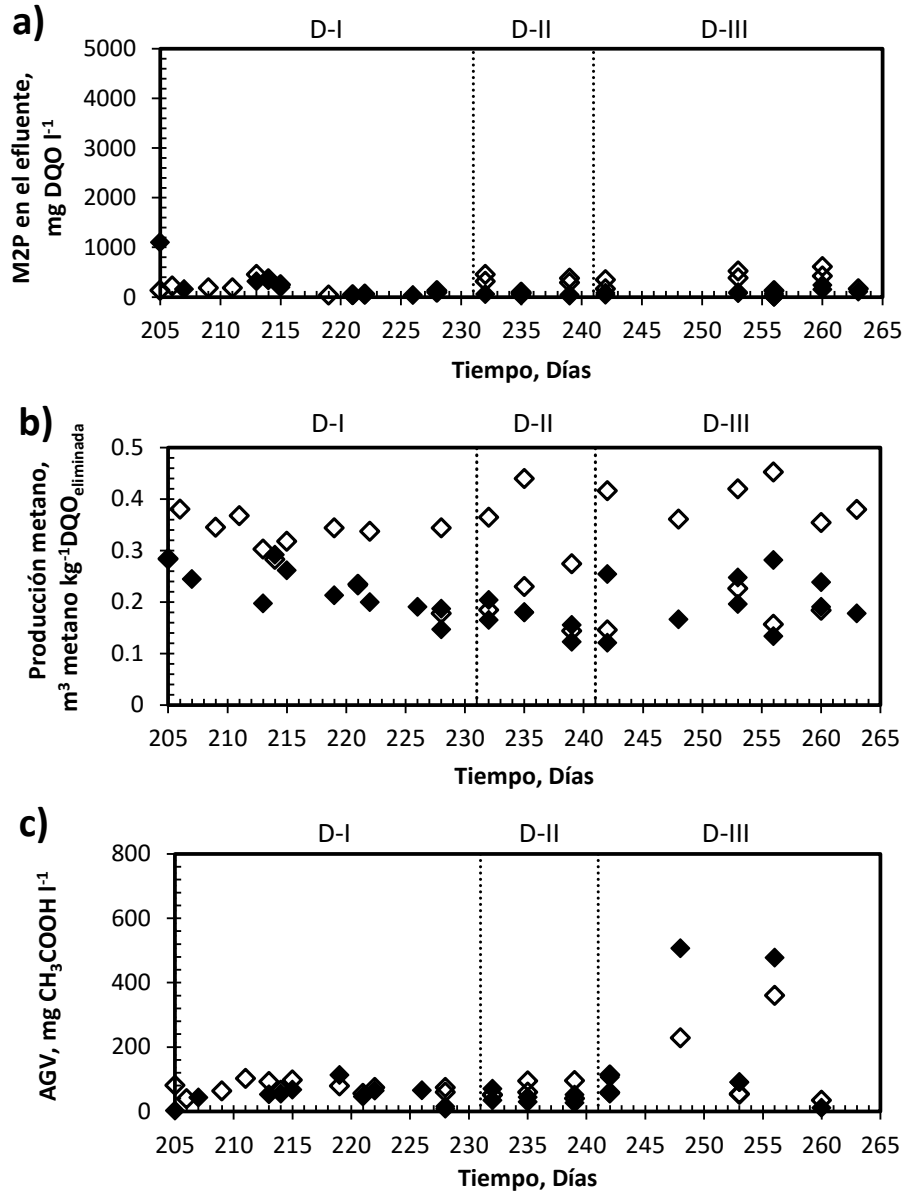


Figura 4.12.- Seguimiento de la variación temporal en los reactores \diamond RAFL 1 y \blacklozenge RAFL 2 de: a) la concentración de DQO en el efluente correspondiente al 1-metoxi-2-propanol, b) producción de metano y c) de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente con aporte intermitente de sustrato.

4.2.5 Respuesta dinámica de los reactores RAFL tras la reanudación del aporte de sustrato tras su corte en los periodos nocturnos y de fin de semana

La respuesta dinámica de los reactores RALF al aporte intermitente de sustrato se evaluó a partir de la medición de la concentración de ácidos grasos volátiles y la producción de metano durante las primeras 10 horas. Los datos de operación tras reanudar diariamente el aporte de sustrato se muestran en la Figura 4.13 para las fases D-I y D-II. En el caso de la fase D-II se presentan los datos tras la interrupción del aporte de sustrato de 8 horas (jueves) o tras 56 horas (lunes).

En la fase D-I, en la que se realizó la alimentación durante 16 horas al día y 7 días a la semana, se observó para ambos reactores un incremento de la producción de metano durante las primeras 6 horas desde el inicio del aporte de sustrato para alcanzar valores pseudo-estacionarios. La concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente se mantuvo por debajo de $74 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$ en ambos reactores, lo que demuestra una buena recuperación de la actividad de los microorganismos productores de metano tras 8 horas sin aporte de sustrato. La baja producción de metano inicial indica que, al comienzo del aporte de sustrato, se producen fenómenos acoplados de transferencia de materia y de degradación en el interior del gránulo. Durante los jueves del periodo D-II, alimentación 16 horas al día durante 5 días a la semana y con carga orgánica idéntica a D-I, se registraron valores similares de producción de metano y de concentraciones de ácidos grasos volátiles a las observadas en la fase D-I en ambos reactores, presentando idéntica capacidad de recuperación tras un periodo sin sustrato de 8 horas. En cambio, el corte en el aporte de suministro durante el fin de semana ralentiza la producción de biogás. En ambos reactores los lunes, tras las primeras 10 horas de aporte de sustrato, se alcanzaron producciones de metano inferiores (reducción del $28.9 \pm 5.0\%$ en el reactor RALF 1 y del $19.9 \pm 2.7\%$ en el reactor RALF 2). Esto demuestra que una interrupción en la alimentación superior a 2 días ralentiza la actividad metabólica de los microorganismos productores de metano.

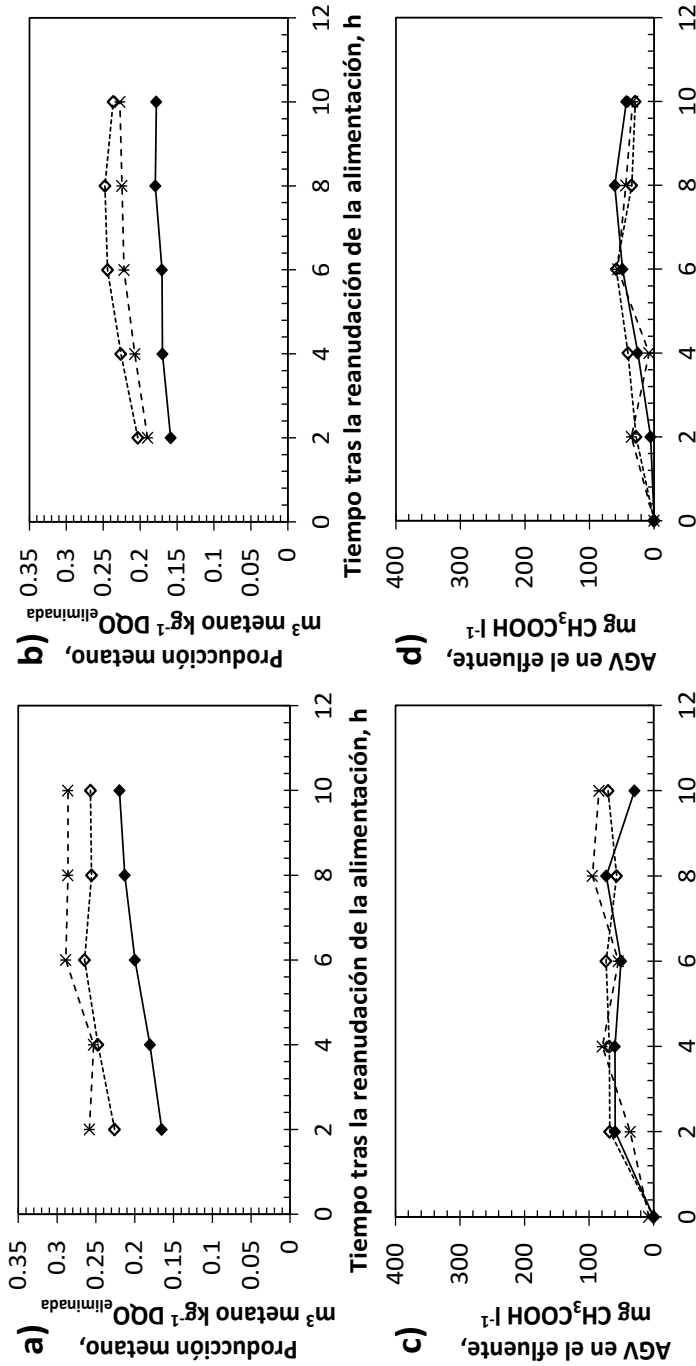


Figura 4.13.- Respuesta dinámica de los dos reactores RALF tras la reanudación de del aporte de sustrato en las fases D-I a D-II. Producción de metano en a) RALF 1, b) RALF 2 y concentración de ácidos grasos volátiles en c) RALF 1 y d) RALF 2. ◇ operación 16 h 7/7 d; ◆ operación 16 h 5/7 d (jueves).

En la Figura 4.14 se comparan los valores obtenidos para las fases D-I y D-III. En el caso de la fase D-III, se produjo en ambos reactores la acumulación de los ácidos grasos volátiles a lo largo de la semana, ya que el sistema no fue capaz de metabolizarlos durante las 10 horas de monitorización del jueves, sugiriendo la sobrecarga de los reactores. Esta acumulación de ácidos grasos volátiles en el seno líquido del reactor sugiere que las condiciones en el interior del gránulo podrían ser todavía más inhibitorias para las bacterias metanogénicas, lo que explicaría la desgranulación observada al final del experimento.

Después de la interrupción de la alimentación durante los fines de semana no se observó esa acumulación de ácidos grasos volátiles (lunes fase D-III). Esto se atribuye a que la biomasa metanogénica disponía de sustrato en exceso durante los fines de semana, es decir que, realmente, aun no existiendo aporte externo de sustrato, la acumulación de ácidos grasos volátiles en el reactor mantenía la actividad metabólica de las metanogénicas prácticamente inalterada. Esto que podría ser beneficioso, resultó problemático debido a la acumulación excesiva de ácidos grasos volátiles durante la semana, y que finalmente provocó la desgranulación del fango.

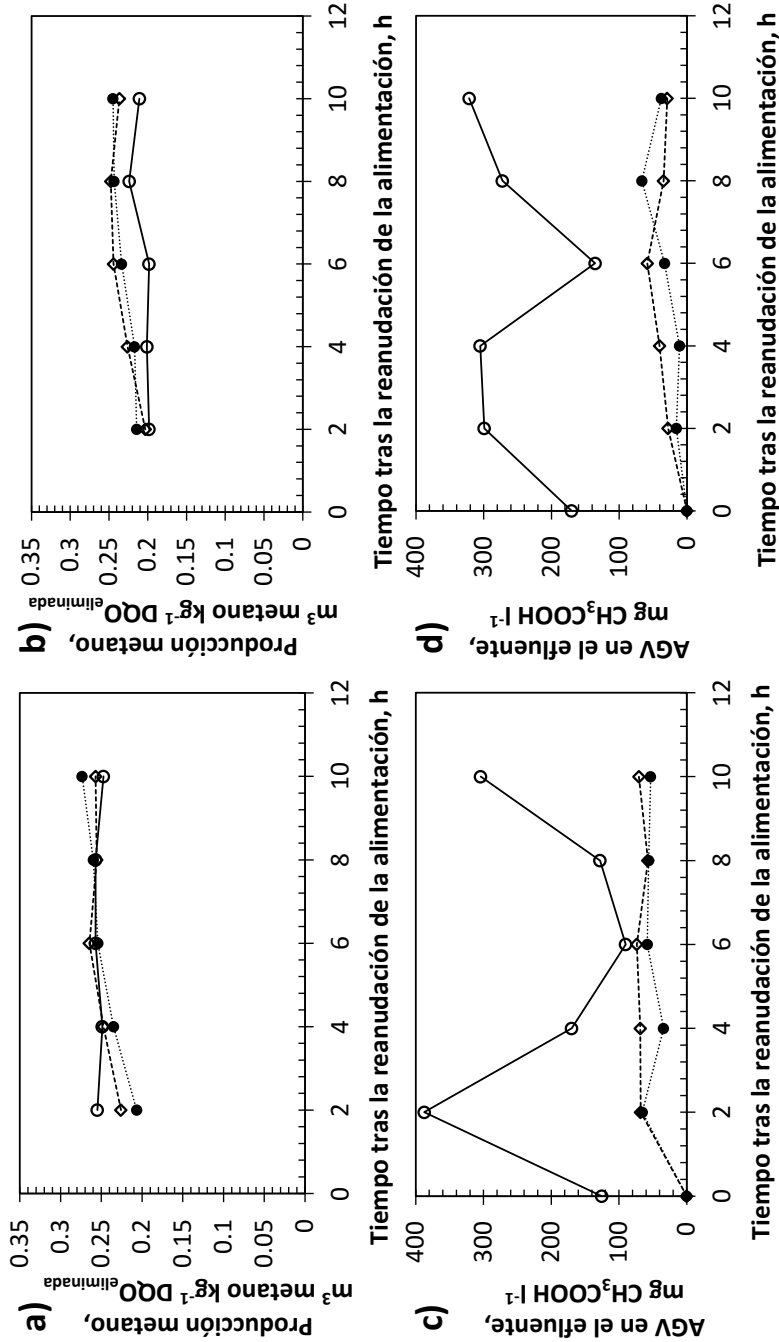


Figura 4.14.- Respuesta dinámica de los dos reactores RALF tras la reanudación de del aporte de sustrato en las fases D-I a D-III. Producción de metano en a) RALF 1, b) RALF 2 y concentración de ácidos grasos volátiles en c) RALF 1 y d) RALF 2. ◇ operación 16 h 7/7 d; ● operación 16 h 5/7 d (lunes); ○ operación 16 h 5/7 d (jueves)

4.2.6 Estudio de la actividad metanogénica específica y del potencial bioquímico de metano

En este apartado se discute sobre la actividad metabólica de la biomasa al final de los experimentos llevados a cabo en los reactores RALF 1 y RALF 2. En la Tabla 4.10 se muestran la actividad metanogénica específica ($\text{ml CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$), el potencial bioquímico de metano ($\text{ml CH}_4 \text{ g DQO}^{-1}$) y el periodo de espera hasta el inicio de la degradación de los disolventes (días). Se realizaron ensayos en discontinuo con cada disolvente por separado y la biomasa de cada reactor se incubó a temperatura de operación. Los resultados obtenidos muestran, como era de esperar, una mayor actividad metanogénica específica y un potencial bioquímico del metano superiores en los ensayos realizados a 25 °C que a 18 °C. Van den Berg (1977) observó diferencias similares en las actividades metanogénicas obtenidas a 18 y 25 °C utilizando como inóculo biomasa proveniente de un reactor alimentado con ácido acético y operado a 35 °C. La menor actividad metabólica obtenida a 18 °C indicaría que no se llegó a establecer un predominio de una población microbiana psicrófila durante los 9 meses de funcionamiento del reactor RALF operado a 18 °C, sino que predominó una comunidad microbiana mesófila tolerante a las bajas temperaturas. Otros autores también han observado el desarrollo de una comunidad microbiana mesófila tolerante a las bajas temperaturas cuando han utilizado un inóculo mesófilico con un reactor anaerobio operado a 15 °C (Enright *et al.*, 2005, 2007; Scully *et al.*, 2006).

La producción de metano en los reactores en discontinuo en los que se introdujo como única fuente de carbono 1-metoxi-2-propanol se produjo tras un tiempo de retardo de 31 días en el caso de los reactores operados a 18 °C y de 6 días en los operados a 25 °C, a pesar de haberse utilizado un inóculo proveniente de los reactores RALF que se encontraba degradando este disolvente. Este resultado muestra como el etanol actúa como co-sustrato y favorece la actividad metabólica implicada en la producción enzimática necesaria para la ruptura del enlace éter de los compuestos éter glicólico. Upadhyay *et al.* (2008) observaron un comportamiento similar con la degradación de fenol en un ensayo con reactores en discontinuo con un inóculo adaptado al fenol proveniente de un reactor RAFA, necesitando un periodo de tiempo de casi un mes para la producción de metano.

Tabla 4.10.- Actividad metanogénicas específica (AME), potencial bioquímico de metano (PBM) y periodo de espera hasta su degradación para la biomasa de los reactores RALF 1 (18 °C) y RALF 2 (25 °C) en la degradación por separado de etanol y 1-metoxi-2-propanol.

	Etanol		1-metoxi-2-propanol	
	18 °C	25 °C	18 °C	25 °C
AME, ml CH ₄ g ⁻¹ SSV d ⁻¹	60.1±2.5	214.5±6.2	7.8±0.1	24.3±2.7
PBM, ml CH ₄ g ⁻¹ DQO	266.2±6.3	330.4±3.6	232.7±6.5	326±7.6
Periodo de espera, días	0	0	31±1.3	6±0.1

4.2.7 Evolución de las poblaciones microbianas

La dinámica de la evolución de las poblaciones microbianas durante la degradación anaerobia de la mezcla binaria compuesta por etanol y 1-metoxi-2-propanol fue caracterizada mediante el uso de técnicas de biología molecular, amplificando los fragmentos de los operones microbianos del ARNr 16S correspondientes a los dominios de *Bacteria* y *Archaea*.

4.2.7.1 Poblaciones de *Bacteria*

En la Figura 4.15 se muestra la imagen del análisis en gel de electroforesis con gradiente desnaturante de las secuencias del 16S correspondientes al dominio *Bacteria*; la numeración de cada perfil corresponde con el número asignado a cada muestra analizada (Tabla 4.5). Se han identificado un total de 10 bandas en las diferentes muestras analizadas, correspondientes al inóculo y a diferentes etapas de la operación de los reactores RALF. Tras los primeros 90 días de operación se observó en ambos reactores un incremento de ribotipos de *Bacteria* debido a los cambios en las condiciones de operación respecto a las que se encontraba el inóculo. El aumento de la diversidad puede estar relacionado con el descenso de la temperatura de operación en relación a la aplicada en el reactor de origen del fango inóculo. Un aumento de la diversidad similar fue observado por Xing *et al.* (2009) tras la disminución de la temperatura de 20 a 15 °C en un reactor RALF que trataba agua residual de una empresa cervecera. La presencia de algunos de los ribotipos en ambos reactores y en el inóculo (bandas 2, 3, 6, 7 y 8) demuestra el establecimiento de una población mesofílica psicrotolerante en el reactor operado a 18 °C a lo largo de toda la operación.

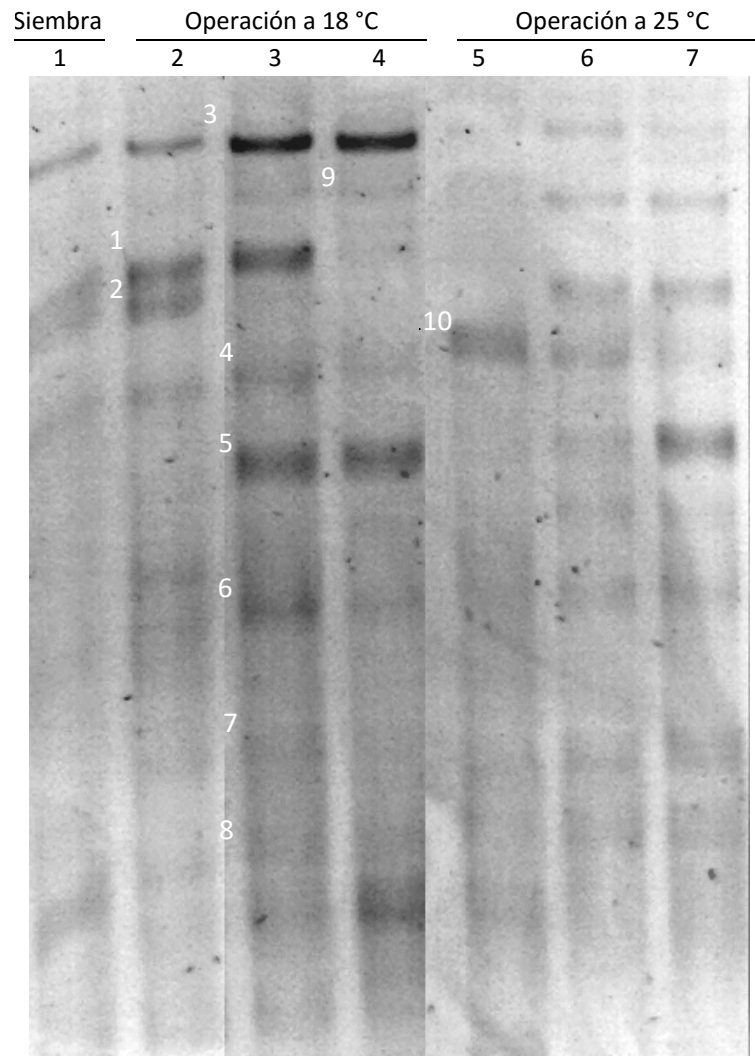


Figura 4.15.- Imagen de gel de la DGGE de las secuencias del ARNr 16S del dominio *Bacteria* para el inóculo y para los reactores RALF 1 y RALF 2. De izquierda a derecha: inóculo (1), operación en continuo a 18 °C (2), operación con alimentación intermitente 16 h d⁻¹/7d a 18 °C (3), operación con alimentación intermitente 16 h d⁻¹/5d a 18 °C (4), operación en continuo a 25 °C (5), operación con alimentación intermitente 16 h d⁻¹/7d a 25 °C (6), operación con alimentación intermitente 16 h d⁻¹/5d a 25 °C (7).

La interrupción de la dosificación de sustrato durante las noches (perfiles 3 y 6), produjo también un aumento en la diversidad respecto a la observada

durante la operación en continuo tanto a 18 como a 25 °C. Este aumento de la biodiversidad se produjo tanto por la aparición de nuevos ribotipos como por el aumento de la concentración de los ya existentes. Sin embargo, la interrupción de la alimentación durante los fines de semana (perfiles 4 y 7), prácticamente no alteró la distribución de bandas a 25 °C. A 18 °C se modificó la intensidad de alguna de ellas y al final de la operación no se encontró la banda 1.

Las especies correspondientes a las bandas aisladas del análisis de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante, así como la similitud de las secuencias y el número de acceso se muestran en la Tabla 4.11. Las especies predominantes de *Bacteria* pertenecen a los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria*, resultados coherentes con otros trabajos en los que se determinó la elevada abundancia relativa de estos dos filos en reactores anaerobios (Satoh *et al.*, 2007). También se ha identificado una especie perteneciente al filo *Thermotogae*.

Tabla 4.11.- Identificación de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S para las bandas aisladas de *Bacteria* al ser comparadas con la base de datos del GenBank (programa BLAST).

Banda	Especie	Similitud de la secuencia, %	Número de acceso	Orden
1	<i>Succinispira mobilis</i>	87	NR 028868.1	<i>Clostridiales</i>
2	<i>Geobacter sp. Candidatus cloacamonas</i>	83	-	<i>Desulfuromonadales</i>
3	<i>acidaminovorans</i>	89	NR 102986.1	-
4	<i>Mesotoga ínfera</i>	78	NR 117646.2	<i>Thermotogae</i>
5	<i>Acetobacterium sp. Clostridium estertheticum</i>	92	-	<i>Clostridiales</i>
6	<i>Clostridium algoriphilum</i>	97	NR 118995.1	<i>Clostridiales</i>
7	<i>Geobacter psychrophilus</i>	88	NR 115146.1	<i>Desulfuromonadales</i>
8	<i>Smithella propionica Candidatus cloacamonas</i>	99	NR 024989.1	<i>Syntrophobacterales</i>
9	<i>acidaminovorans</i>	90	NR 102986.1	-
10	<i>Mesotoga ínfera</i>	78	NR 117646.2	<i>Thermotogae</i>

Los microorganismos pertenecientes a *Firmicutes* se asocian frecuentemente a bacterias adaptadas a pH ácidos y a elevadas concentraciones

de sales en el medio y han sido detectados como mayoritarios tras la reducción de la temperatura en los reactores anaerobios (Xing *et al.*, 2009). Este filo se encuentra representado en ambos reactores por un único orden, *Clostridiales*. Krause *et al.* (2008) también describieron este orden como mayoritario en el filo *Firmicutes* en un reactor mesofílico que degradaba residuos agrícolas. Las especies pertenecientes a este orden pueden realizar un metabolismo secundario asociado a la degradación de ácidos orgánicos y aminoácidos obteniendo como productos ácido acético, alcoholes o CO₂ y H₂ dependiendo del sustrato utilizado (Jung *et al.*, 2011). Las especies pertenecientes a este orden se las identifica en las bandas 1, 5 y 6 (Figura 4.15).

La banda 1 ha sido identificada como una bacteria gram negativa móvil con flagelos laterales llamada *Succinispira mobilis*. Este microorganismo posee un metabolismo quimiorganotrofo fermentativo de un gran número de sustratos entre los que no se incluyen alcoholes, formando como productos finales de la fermentación formiato, acetato, propionato, malato o CO₂/H₂, dependiendo del sustrato utilizado. Posee actividad hidrogenasa y la temperatura e intervalo de pH óptimos son 37 °C y 7.4-7.7, respectivamente (Janssen *et al.*, 1999). La poca afinidad que presenta a los sustratos presentes en los reactores puede ser el motivo de su ausencia al final de la operación a 18 °C y durante toda la operación a 25 °C.

La banda 5 presenta una similitud idéntica con varias especies pertenecientes al género *Acetobacterium*. Las especies de este género se caracterizan por ser gram positivas y poseer un metabolismo homoacetogénico en el que el hidrógeno es oxidado y el CO₂ reducido para formar ácido acético. La actividad de este microorganismo no se ve afectada por valores de pH tan bajos como 5 y su óptimo de temperatura se encuentra dentro del intervalo mesofílico (Balch *et al.*, 1977). La presencia de este microorganismo en los reactores puede resultar clave, ya que se ha demostrado que este género puede formar la enzima que permite la ruptura del enlace éter de éteres glicólicos (Schramm y Schink, 1991). La baja presencia de esta especie en los primeros ensayos del experimento puede deberse a que las condiciones ambientales, principalmente la temperatura de operación, provocaron que la cinética de crecimiento fuera lenta.

La banda 6 presenta similitud para dos especies distintas del género *Clostridium*, *Clostridium estertheticum* y *Clostridium algoriphilum*. Ambas especies se caracterizan por crecer en medios con baja temperatura, ser gram positivas y formar esporas. La capacidad de estos microorganismos para crecer en ambientes con bajas temperaturas tuvo como consecuencia una mayor concentración de

éstos tras más de 100 días de operación del reactor operado a 18 °C, tal y como indica la mayor intensidad de la banda en el gel de electroforesis con gradiente desnaturalizante del perfil 3 (Figura 4.15). Estas dos especies se diferencian por su metabolismo, *C. algoriphilum* degrada sacáridos y disacáridos para dar como producto final, en función del sustrato utilizado, acetato, butirato, lactato, H₂, CO₂, formato o etanol (Shcherbakova *et al.*, 2005), mientras que *C. estertheticum* puede formar butirato, formato, acetato, lactato, butanol (Yang *et al.*, 2009) o H₂/CO₂ (Helps *et al.*, 1999) a partir de glucosa y lactato, entre otros.

El filo *Proteobacteria* se encuentra representado en las muestras analizadas por dos órdenes: *Desulfuromonadales* y *Syntrophobacterales*. El orden *Desulfuromonadales* es el mayoritario en las muestras de los reactores, siendo *Geobacter* el único género presente. Los microorganismos de este género son capaces de oxidar compuestos orgánicos y metales como el hierro. También pueden utilizar este último disuelto o no en el medio como único aceptor de electrones acoplado a la oxidación del acetato (Sun *et al.*, 2014), aunque también pueden utilizar otros dadores de electrones como lactato, piruvato o etanol (Shelobolina *et al.*, 2008). El rango de temperatura para el crecimiento de estas especies es amplio, de 15 a 42 °C. La única especie del género *Geobacter* identificada es *Geobacter psychrophilus*, cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 17 y 30 °C, lo que explica su presencia en ambos reactores. Esta especie es capaz de oxidar sustratos como etanol o acetato a partir de la reducción de hierro (III) u óxidos de manganeso (Nevin *et al.*, 2005). *Smithella propionica* es la única especie del orden *Syntrophobacterales* presente en los reactores. Esta especie se ha detectado tanto en el inóculo como durante toda la operación de ambos reactores. La peculiaridad de este microorganismo es que crece en simbiosis con las especies metanogénicas hidrogenotrofas o consumidoras de formiato en condiciones mesofílicas, ya que su metabolismo se basa en la oxidación de ácido propiónico para la formación como productos finales H₂ o formiato.

Las bandas 4 y 10 muestran ribotipos similares, correspondientes a la especie *Mesotoga infera*, del filo *Thermotogae*. Esta bacteria es una gram negativa mesófila anaerobia estricta, con un óptimo de temperatura de 45 °C. Su metabolismo es heterotrófico y puede utilizar arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, lactato, manosa, maltosa, rafinosa, ribosa, sacarosa y xilosa como fuentes de energía en presencia de azufre elemental, que es el aceptor final de electrones, formando acetato, CO₂ y sulfuro como productos finales (Ben Hania *et al.*, 2013). El cambio en la composición del alimento durante el experimento A con la reducción en un 80% de la concentración de sulfatos pudo ser el causante de la desaparición de esta especie en ambos reactores.

Las bandas 3 y 9 se han identificado como *Candidatus cloacamonas acidamivorans*. Estas bacterias poseen proteínas típicas de microorganismos anaerobios y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, por lo que puede crecer también en presencia de bajas concentraciones de oxígeno. Este microorganismo obtiene energía a partir de la fermentación de aminoácidos, azúcares y ácidos carboxílicos, obteniendo como productos CO₂ e hidrógeno. El metabolismo catabólico se realiza mediante fosforilación oxidativa a nivel de sustrato y la síntesis de reductores como la ferredoxina, que es una proteína que se observa en las bacterias anaerobias que forman relaciones sintróficas. *C. Cloacamonas acidaminovorans* también posee la enzima formiato deshidrogenasa (Pelletier *et al.*, 2008), que cataliza la reacción de transformación del ácido propiónico a H₂ y CO₂ (Graentzdoerffer *et al.*, 2003).

4.2.7.2 Poblaciones de Archaea

Los resultados obtenidos durante el análisis mediante electroforesis en gel desnaturalizante de las secuencias del dominio *Archaea* se muestran en la Figura 4.16. Estos resultados muestran cuatro ribotipos diferentes, los cuales han sido aislados y secuenciados satisfactoriamente. El menor número de bandas observado en el análisis de *Archaea* revela que la diversidad de este dominio es menor que el de *Bacteria*. La prevalencia del dominio *Bacteria* en sistemas anaerobios ha sido observada por otros autores durante el estudio de cultivos mesofílicos (Fernández *et al.*, 1999; Godon *et al.*, 1997) y psicrófilicos (Collins *et al.*, 2003). Además, las poblaciones de *Arquea* identificadas en este estudio se conservan a lo largo de la operación de ambos reactores, sin mostrar una relación directa entre los cambios en las condiciones de operación y la diversidad de estos microorganismos en el reactor.

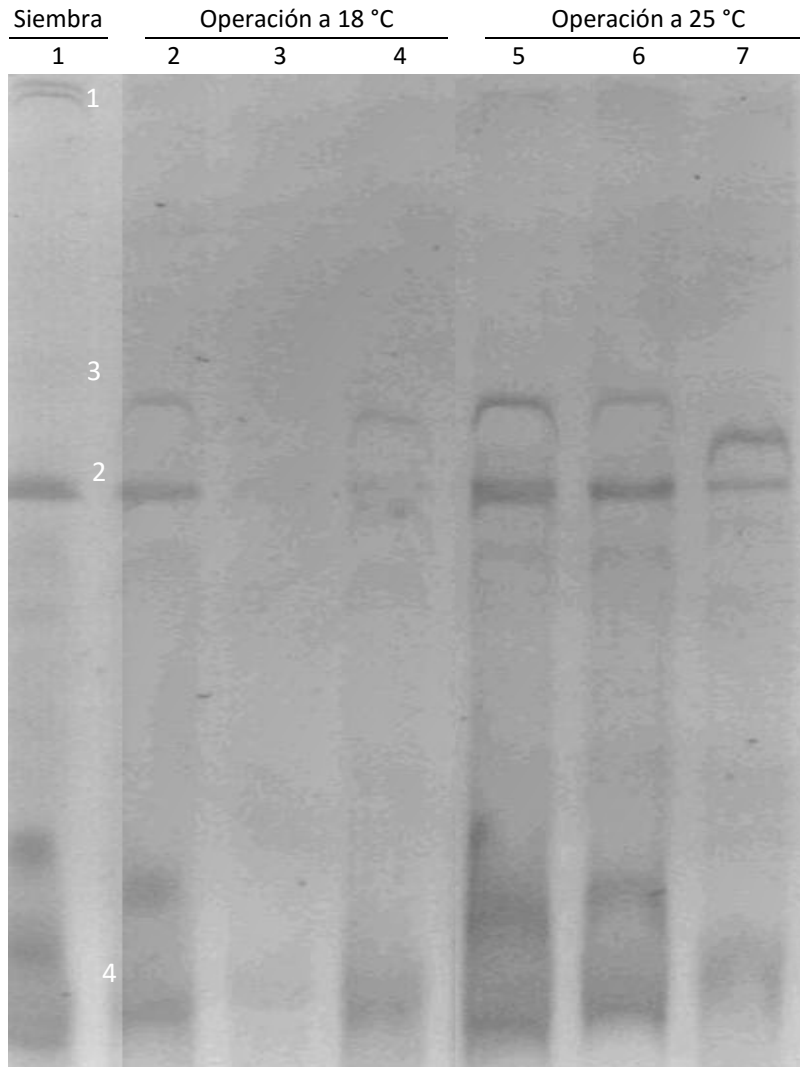


Figura 4.16.- Imagen de gel de la DGGE de las secuencias del ARNr 16S del dominio *Archaea* para el inóculo y para los reactores. De izquierda a derecha: inóculo (1), operación en continuo a 18 °C (2), operación con alimentación intermitente 16 h d⁻¹/7d a 18 °C (3), operación con alimentación intermitente 16 h d⁻¹/5d a 18 °C (4), operación en continuo a 25 °C (5), operación con alimentación intermitente 16 h d⁻¹/7d a 25 °C (6), operación con alimentación intermitente 16 h d⁻¹/5d a 25 °C (7).

Durante la operación con la mezcla binaria de disolventes se observó en ambos reactores la evolución de las poblaciones de *Archaea* respecto al inóculo.

Este cambio en la estructura poblacional de estos microorganismos se encuentra asociado a la selección biológica ejercida por las condiciones de operación y del sustrato disponible durante la operación de los reactores de laboratorio, que son diferentes a las aplicadas en el reactor de origen del inóculo. La estabilidad y similitud de los microorganismos implicados en la producción de metano a las dos temperaturas de trabajo, 18 y 25 °C, confirman el establecimiento de una comunidad de especies del dominio de *Archaea* mesofílicas psicrotolerantes.

Los microorganismos identificados a partir de las secuencias aisladas de cada banda se muestran en la Tabla 4.12. Los resultados del análisis filogenético muestran que todas las arqueas presentes en los reactores pertenecen al orden *Methanomicrobiales*, siendo el género con mayor presencia *Methanosaeta*. Este género está compuesto por microorganismos acetotrofos estrictos y se observa con frecuencia en reactores operados bajo condiciones mesofílicas (Colleran *et al.*, 2003; Laloui-Carpentier *et al.*, 2006), teniendo gran importancia en la metanogénesis en los reactores de tipo RAFA (Gonzalez-gil *et al.*, 2001; Guiot *et al.*, 1992; MacLeod *et al.*, 1990). Además, el género *Methanosaeta* es uno de los principales en la syntrofia para la degradación de etanol (Han *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2014), disolvente mayoritario en la mezcla binaria presente en el influente de los reactores.

Tabla 4.12.- Identificación de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S de las bandas aisladas de *Archaea* al ser comparadas con la base de datos del GenBank (programa BLAST).

Banda	Especie	Similitud		Orden
		de la secuencia, %	Número de acceso	
1	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	99	NR 102896.1	<i>Methanomicrobiales</i>
2	<i>Methanospirillum lacunae</i>	100	NR 112981.1	
3	<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	100	NR 074173.1	
4	<i>Methanosaeta concilii</i>	100	NR 102903.1	

La baja presencia de ácidos grasos volátiles en ambos reactores, y probablemente en el reactor de procedencia del inóculo, ha supuesto una ventaja competitiva del género *Methanosaeta*, por su elevada afinidad por el sustrato frente al otro género del orden de *Methanomicrobiales*, *Methanosarcina*, que

también utiliza ácido acético como sustrato. A pesar de que la presencia de *Methanosarcina* en el reactor produce la formación espontánea de los gránulos (Wiegant y Man, 1986), se ha demostrado que la presencia de forma dominante de los filamentos que forman los microorganismos del género *Methanosaeta* son necesarios para el mantenimiento de la morfología granular durante la operación del sistema (Gonzalez-gil *et al.*, 2001; Grotenhuis *et al.*, 1991).

La matriz del reactor del que provino el inóculo, cervecera de Font Salem, puede explicar la presencia de la especie *Methanosaeta harundinacea* (banda 1) al comienzo del experimento, ya que fue observada por primera vez en un reactor que trataba agua residual proveniente de la industria cervecera (Ma *et al.*, 2006). La desaparición de esta especie durante la operación de los reactores de laboratorio, junto con la similitud en la matriz del fango inóculo y del reactor donde se describió por primera vez esta especie, indican que se produjo una selección causada por el cambio del sustrato. Por otro lado, *Methanosaeta concilii* (banda 2) se mantuvo presente en los dos reactores desde el inicio de la operación. Esta especie utiliza como única fuente de energía ácido acético, aunque también puede utilizar CO₂ para el crecimiento. La producción de metano y CO₂ es equimolar y su crecimiento se ve estimulado por la fluidización del lecho, aunque no crece en medios donde el metanol es el único sustrato (Patel, 1984).

La presencia de géneros hidrogenotróficos pertenecientes al orden de *Methanomicrobiales* se encuentra relacionada con las bajas temperaturas, siendo el género *Methanocorpusculum* característico de la operación en reactores a bajas temperaturas (O'Reilly *et al.*, 2009). Por ello, la operación bajo condiciones de temperatura sub-óptimas utilizadas a escala de laboratorio propició el crecimiento de la especie *Methanocorpusculum labreanum* (banda 3) en ambos reactores. Esta especie es capaz de producir metano a partir de hidrógeno o formiato, pero no de otros compuestos como metanol, etanol o acetato. Para su crecimiento es necesaria la adición de extracto de levadura o triptasa pentona en el reactor y la presencia de acetato lo estimula (Zhao *et al.*, 1989). La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, aunque se ha observado como mayoritario en reactores operados a 15 °C (O'Reilly *et al.*, 2009).

La especie *Methanospirillum lacunae* (banda 2) estuvo presente en el reactor desde el inicio de la operación. La presencia de las especies de este género en los reactores anaerobios ha sido asociada a la degradación de etanol (Grotenhuis *et al.*, 1991) y a las bajas temperaturas de operación (Xing *et al.*, 2009). Al igual que *M. labreanum*, *M. lacunae* produce metano a partir de hidrógeno o formiato, pero no a partir de acetato, metanol, etanol o acetato,

aunque sí que utiliza este último sustrato en su crecimiento. El intervalo de temperatura para este microorganismo está comprendido entre 15 y 37 °C, siendo el óptimo de 35 °C (Iino *et al.*, 2010).

La ausencia de especies del dominio *Archaea* capaces de utilizar como sustrato etanol o metanol de forma directa indica que la degradación completa de estos compuestos hasta metano se realizó de forma sintrófica. La sintrofia para la degradación de etanol se encuentra bien descrita en la bibliografía y se compone por una bacteria encargada de la deshidrogenación del etanol, normalmente del filo *Firmicutes*, y una *Archaea* acetotrofa de la familia *Methanosarcinae*. Por otro lado, Tarasov *et al.* (2011) demostraron que algunos microorganismos pertenecientes al dominio *Bacteria* son capaces de degradar el metanol formando como subproducto hidrógeno, que sería consumido por una arquea hidrogenotrofa, estableciendo así otra relación sintrófica.

4.3 CONCLUSIONES

Los experimentos presentados en este capítulo se han centrado en el estudio de la degradación mediante un reactor anaerobio del tipo RALF a escala de laboratorio de una corriente de agua residual sintética que contenía una mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol en condiciones psicofílicas a 18 °C (RALF 1) y mesofílicas sub-óptimas a 25 °C (RAFL2) con alimentación continua e intermitente. Este estudio constituye el primer trabajo de este tipo para 1-metoxi-2-propanol, disolvente de uso industrial muy habitual. Las conclusiones que se pueden extraer a partir de los resultados obtenidos se exponen a continuación.

El estudio previo de la adaptación de los microorganismos anaerobios a las temperaturas operacionales de 18 y 25 °C que se realizó con etanol como único sustrato fue satisfactorio en términos de eficacia de degradación de etanol. La carga orgánica máxima tratada para alcanzar una eficacia de eliminación superior al 90% fue de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en el reactor psicofílico y de 30 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en el reactor mesofílico, mostrando que la velocidad de las reacciones biológicas disminuye a bajas temperaturas. Ambos valores son similares a los encontrados en la bibliografía para este compuesto. La acumulación de ácidos grasos volátiles tras el aumento de la carga orgánica al inicio de cada fase durante el experimento de la puesta en marcha bajo condiciones psicofílicas indica que la etapa limitante en la degradación anaerobia de etanol es la etapa metanogénica. Además, la menor producción de metano por unidad de DQO eliminada en el reactor operado a 18 °C

muestra que Los microorganismos encargados de esta etapa mostraron ser más sensibles a los cambios de temperatura que los microorganismos acidogénicos.

Tras la adaptación de los microorganismos a las condiciones mesofílicas y psicofílicas, el cambio en la composición del sustrato para introducir 1-metoxi-2-propanol resultó en un periodo de adaptación en el que la degradación de este compuesto fue baja. La duración de este periodo de adaptación de la biomasa al uso de 1-metoxi-2-propanol como sustrato fue mayor para el reactor operado en condiciones psicofílicas, de casi dos meses, frente al reactor operado en condiciones mesofílicas, de 34 días. Los largos periodos de adaptación de la biomasa para la degradación de 1-metoxi-2-propanol están relacionados con la ausencia de las enzimas encargadas de la ruptura del enlace éter en el inóculo. Estas enzimas son producidas lentamente durante la degradación de etanol en los reactores RALF.

Las máximas cargas orgánicas de 1-metoxi-2-propanol que se lograron degradar con eficacias superiores al 90% fueron de 6.1 y de 9 kg DQO m⁻³ d⁻¹ para los reactores operados a 18 °C y a 25 °C, respectivamente con aporte continuo de sustrato. La influencia de la temperatura sobre la degradación de etanol y de 1-metoxi-2-propanol fue similar, siendo necesario reducir en un tercio la carga orgánica aplicada de cada compuesto a 18 °C para obtener eficacias de eliminación similares a las de 25 °C.

La producción de metano se mantuvo estable una vez se alcanzaron las eficacias de eliminación elevadas para los dos disolventes y con valores similares en los dos reactores, comprendidos entre 0.20 y 0.34 m³ metano kg⁻¹ DQO_{eliminada}. Para una carga orgánica similar, la mayor concentración de ácidos grasos volátiles obtenida en el reactor operado bajo condiciones psicofílicas muestra la menor actividad de los microorganismos metanogénicos a bajas temperaturas, siendo éste un hecho a tener en cuenta en la aplicación industrial de esta tecnología.

La reanudación del proceso tras una parada de un mes del funcionamiento de los reactores RALF mostró un periodo de retardo para alcanzar la degradación de cargas orgánicas de 1-metoxi-2-propanol similar al observado tras la inoculación. Esto indicó la pérdida de la actividad enzimática necesaria para la degradación del 1-metoxi-2-propanol tras la ausencia prolongada de exposición al sustrato, sugiriendo que para la aplicación industrial es conveniente que no se produzcan cambios bruscos en el uso de este disolvente.

El aporte de sustrato con interrupciones cíclicas nocturnas y de fin de semana provocó el descenso en la capacidad máxima de degradación de 1-metoxi-

2-propanol, siendo las máximas cargas orgánicas eliminadas de 6.5 y 7.2 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ para obtener eficacias de eliminación superiores al 91 y 98% en los reactores operados a 18 °C y a 25 °C, respectivamente. En ambos reactores se observó una rápida recuperación de la actividad metanogénica después de 8 horas sin aporte de sustrato. En cambio, periodos sin alimentación de 56 horas produjeron una menor producción de metano durante al menos las primeras 10 horas de funcionamiento, mostrando el efecto negativo que una interrupción en el aporte de sustrato de más de 2 días tiene sobre la actividad metanogénica del reactor.

Cargas orgánicas superiores provocaron un desequilibrio del proceso anaerobio con una acumulación a lo largo de la semana de los ácidos grasos volátiles, con la consiguiente inhibición de la actividad metanogénica en el interior del gránulo y su desintegración, lo que indica la importancia de reducir la carga orgánica a depurar en caso de fluctuaciones importantes en el aporte de sustrato.

Del estudio de las poblaciones microbianas se extrae que la diversidad del dominio *Bacteria* es superior al de *Archaea*, tanto en el inóculo como durante la operación de los dos reactores. El dominio *Bacteria* se encuentra mayoritariamente representado por especies del filo *Firmicute* y *Proteobacteria*, destacando dentro del primer filo la presencia del orden *Clostridiales* y del segundo el orden *Desulfuromonadales*. Se ha determinado la presencia de especies del género *Acetobacterium*, que ha sido relacionada con la producción de las enzimas necesarias para romper el enlace éter en éteres glicólicos.

Del estudio de la población de arqueas destaca la ausencia de especies capaces de degradar de forma directa el etanol o el metanol, indicando que la degradación de ambos alcoholes se produce por sintrofia con otros microorganismos. La especie del dominio *Archaea* presente en la sintrofia para la degradación de etanol es *Methanosaeta concilii*, que además tiene funciones de mantenimiento de la morfología granular. Las bajas temperaturas de los reactores propiciaron el crecimiento de dos especies hidrogenotrofas como son *Methanocorpusculum labreanum* y *Methanospirillum lacunae*.

Estos resultados demuestran la viabilidad de los reactores RAFL para tratar un agua residual de mezclas de disolventes que contienen 1-metoxi-2-propanol a temperatura ambiente (18-25 °C). Además, los resultados ponen de manifiesto la importancia de estudiar el proceso bajo condiciones experimentales lo más ajustadas posibles a los patrones de emisión en las instalaciones industriales.

**5 DEGRADACIÓN DE UNA MEZCLA DE DISOLVENTES EN
CONDICIONES MESOFÍLICAS**

Los disolventes utilizados en la industria flexográfica se pueden clasificar en función de su aplicación en disolventes verdaderos (etanol o isopropanol), diluyentes o acelerantes (acetato de etilo) y retardantes (1-metoxi-2-propanol) (European Commission, 2009). Por ello, dependiendo del acabado deseado, la aplicación de disolventes a nivel industrial (composición y concentración) suele tener modificaciones. Entre los disolventes oxigenados ampliamente utilizados en los procesos de producción en los que se usan tintas y pinturas son habituales etanol, 1-metoxi-2-propanol, acetato de etilo, isopropanol y acetona. En este capítulo se presenta el estudio a escala de laboratorio de la degradación anaerobia de diferentes mezclas de estos compuestos.

En la bibliografía se encuentran ejemplos que muestran la posibilidad de degradar anaerobiamente de forma individual acetato de etilo (Henry *et al.*, 1996; Speece, 1983), isopropanol (Widdel, 1986) y acetona (Schwartz, 1991; Symons y Buswell, 1932), que es un metabolito intermedio de la degradación del isopropanol (Taylor *et al.*, 1980; Tonouchi, 2004). No obstante, no existe información previa acerca de la degradación de una mezcla de estos disolventes. En este trabajo se estudiará la degradación de estos compuestos en presencia de etanol como componente mayoritario y de 1-metoxi-2-propanol, disolvente para el que se ya se demostró su degradación anaerobia en el capítulo anterior.

Este estudio se realizó en un reactor RAFL operado bajo condiciones mesofílicas de 25 °C. La puesta en marcha del reactor anaerobio se trabajó con aporte de sustrato en continuo y con diferentes mezclas de disolventes. Durante la puesta en marcha se aplicaron cargas orgánicas bajas para favorecer la adaptación de los microorganismos a la degradación de todos los disolventes presentes en la mezcla. Después se aumentó de forma progresiva la carga orgánica de acetato de etilo hasta ser mayoritario en la mezcla. Una vez alcanzada la carga orgánica para la que se tenía una capacidad de eliminación elevada, ésta se mantuvo constante a la vez que se modificó progresivamente la mezcla de disolventes, de forma que se pasó de una mezcla en la que acetato de etilo era el compuesto principal a otra en la que era etanol, hasta alcanzar porcentajes habituales a los esperados en la aplicación descrita.

5.1 PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo que se siguió para los experimentos de la degradación anaerobia de un agua residual con una mezcla de disolventes en un reactor RAFL de laboratorio operado a 25 °C se detalla en los siguientes apartados.

5.1.1 Puesta en marcha del reactor RALF

La puesta en marcha del reactor RAFL se realizó bajo las condiciones de operación descritas en la Tabla 5.1. Se utilizó como sustrato una mezcla de disolventes compuesta por etanol como mayoritario, 1-metoxi-2-propanol, acetato de etilo, isopropanol y acetona en las concentraciones másicas indicadas en la Tabla 5.1. La acetona, producto intermedio de la degradación del isopropanol, es también un disolvente habitual de las tintas y fue incluida en la mezcla con el fin de determinar si este compuesto es biodegradable anaeróbicamente en presencia de otros disolventes. La degradación de cada compuesto se determinó a partir de la cuantificación de su presencia en el efluente mediante cromatografía gaseosa.

Tabla 5.1.- Puesta en marcha del reactor RALF para la degradación anaerobia de un sustrato compuesto por una mezcla de disolventes.

	MA-I	MA-II
Temperatura, °C	25	25
v_s , m h ⁻¹	9.2	9.2
C_e , g l ⁻¹	8	8
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	5	5
% en masa de los contaminantes en el alimento		
Etanol	55	49.5
1-metoxi-2-propanol	15	13.5
Acetato de etilo	15	13.5
Isopropanol	15	13.5
Acetona	-	10

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; CO: carga orgánica

5.1.2 Influencia de la carga orgánica en la degradación anaerobia de una mezcla de disolventes en un reactor RALF

Tras la puesta en marcha del reactor RALF se realizó un experimento en el que, manteniendo constante la carga orgánica total aportada por los compuestos etanol, 1-metoxi-2-propanol, acetona e isopropanol (5 kg DQO m⁻³ d⁻¹), se aplicaron 5 cargas crecientes de acetato de etilo comprendidas entre 5 y 40 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Tabla 5.2.- Plan de incremento en la carga orgánica aplicada de acetato de etilo en un reactor RALF operado con sustrato multicomponente.

	MB-I	MB -II	MB -III	MB -IV	MB -V
Temperatura, °C	25	25	25	25	25
v_s , m h ⁻¹	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2
C_e , g l ⁻¹	8	8	8	8	11.9
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	10	15	20	30	45
CO acetato de etilo, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	5.3	10.2	15.1	25.1	40
	% en masa en el influente				
Acetato de etilo	56.8	71.2	78.4	85.6	90.4
Etanol	24.8	16.5	12.4	8.2	5.5
1-metoxi-2-propanol	6.8	4.5	3.4	2.2	1.5
Isopropanol	6.8	4.5	3.4	2.2	1.5
Acetona	5.0	3.3	2.5	1.7	1.1

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; CO: carga orgánica

5.1.3 Influencia del cambio de composición en etanol y acetato de etilo en un reactor RALF con un sustrato multicomponente

A partir de los resultados que se obtuvieron en el estudio previo, se diseñó un experimento adicional con el fin de evaluar la influencia que el cambio de acetato de etilo por etanol tiene sobre la eficacia del proceso. Esta variación se realizó en tres etapas y consistió en reemplazar al acetato de etilo como contaminante mayoritario por etanol manteniendo la carga orgánica total constante, tal y como muestra la Tabla 5.3. La velocidad superficial aplicada sobre el reactor anaerobio se incrementó de 9.2 a 12.8 m h⁻¹ durante este experimento mediante el aumento del caudal de la corriente de recirculación con el fin de favorecer la expansión y la fluidización del lecho del reactor.

Tabla 5.3.- Plan para la modificación de la proporción de etanol y acetato de etilo en un reactor RALF.

	MC-I	MC-II	MC-III
v_s , m h ⁻¹	12.8	12.8	12.8
C_e , g l ⁻¹	11.9	11.9	11.9
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	45	45	45
CO acetato de etilo, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	29.2	19	9.5
CO etanol, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	13.7	23.9	33.5
	% en masa en el influente		
Acetato de etilo	68.2	45.9	23.7
Etanol	27.7	49.9	72.2
1-metoxi-2-propanol	1.5	1.5	1.5
Isopropanol	1.5	1.5	1.5
Acetona	1.1	1.1	1.1

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; CO: carga orgánica

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1 Puesta en marcha del reactor RALF

Los resultados correspondientes a la puesta en marcha del reactor RALF se muestran en la Tabla 5.4. De estos valores destaca el aumento de la eficacia de eliminación a partir del día 37, asociado a la adaptación de los microorganismos al uso de disolventes de menor biodegradabilidad como sustrato. El aumento de la conductividad está asociado a la adición de 5 g NaHCO₃ l⁻¹ en el influente con el fin de mantener el pH en valores neutros.

Tabla 5.4.- Resultados experimentales en la puesta en marcha de un reactor RALF para la degradación anaerobia de una mezcla multicomponente de disolventes. Valores promedio y su desviación estándar.

	MA-I	MA-II
Días de operación	0-20	21-48
Temperatura, °C	25.1±1.4	25.3±0.9
v_s , m h ⁻¹	8.4±1.1	9.1
C_e , mg DQO l ⁻¹	6853±1487	6862±1133
C_s , mg DQO l ⁻¹	1325±157*	1660±79/144±54**
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	4.5±0.7	4.8±0.8
EE global, %	78.2±5.6*	74.9±6.6/97.9±0.7**
pH	7.5±0.1	7.5±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	6.6±1.7	8±0.3
Potencial redox, mV	-399.5±2.4	-396.4±6.3
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	2884±624	3653±322
Composición del influente en % en masa		
Etanol	55	49.5
1-metoxi-2-propanol	15	13.5
Acetato de etilo	15	13.5
Isopropanol	15	13.5
Acetona	-	10

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; C_s : concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación

*Calculado a partir del día 13.

**Calculado para dos periodos diferentes: del 22 al 36/del 37 a fin

En la Figura 5.1 se representa la variación temporal de la carga orgánica (kg DQO m⁻³ d⁻¹), de la eficacia de eliminación global (%) y de la concentración de DQO en el efluente (mg DQO l⁻¹) para el periodo de puesta en marcha. Durante la primera etapa, fase MA-I, la eficacia de eliminación global descendió con un aumento progresivo de la concentración de DQO en el efluente hasta alcanzar valores superiores a 1700 mg DQO l⁻¹. El análisis de cromatografía del efluente indicó que éste se componía de 1-metoxi-2-propanol e isopropanol exclusivamente, sin que existiera prácticamente biodegradación de estos compuestos durante los primeros 20 días de operación. Por otro lado, etanol y acetato de etilo se degradaron biológicamente con eficacias de eliminación superiores al 99.9% desde el comienzo del experimento.

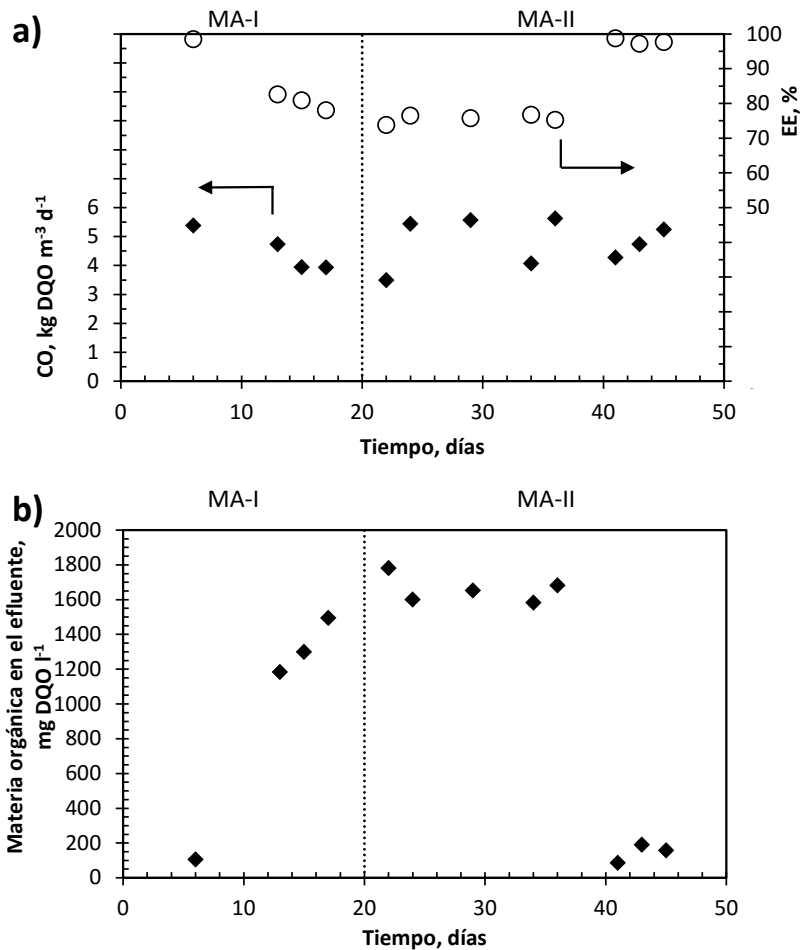


Figura 5.1.- Variación temporal de: a) carga orgánica y de la eficacia de eliminación y b) concentración de materia orgánica en el efluente durante la puesta en marcha del reactor RALF para la degradación de una mezcla multicomponente de disolventes.

Al comienzo de la fase MA-II de la experimentación se introdujo otro disolvente de uso industrial, acetona, que está documentado como metabolito intermedio en la degradación anaerobia de isopropanol. La degradación de la acetona se produjo muy rápidamente, a los 4 días tras su adición la concentración de materia orgánica en el efluente alcanzó los valores similares a los de la etapa anterior, en torno a 1600 mg DQO l⁻¹, sin que se detectara este compuesto en el efluente. La adaptación de los microorganismos anaerobios a 1-metoxi-2-propanol e isopropanol se produjo tras 41 días de operación observándose una rápida

reducción de la concentración de materia orgánica en el efluente hasta alcanzar valores inferiores a 200 mg DQO l⁻¹. Los análisis mediante cromatografía del efluente mostraron la completa degradación de 1-metoxi-2-propanol, siendo el isopropanol el único disolvente en el efluente, pero con una eficacia de eliminación de éste superior al 87%. El tiempo necesario para la adaptación de la biomasa a 1-metoxi-2-propanol fue similar al que se requirió para su degradación de una mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol (4:1 en masa) al operar el reactor RALF a la misma temperatura (Capítulo 4).

En la bibliografía también se describe la necesidad de un periodo de adaptación para la degradación anaerobia de isopropanol. El periodo de adaptación necesario en este estudio fue superior al observado por Tonouchi (2004), que señaló un periodo de latencia de 20 días utilizando reactores en discontinuo incubados a 30 °C. La biodegradabilidad de la acetona en condiciones anaerobias ha sido descrita por otros autores. Así, Schwartz (1991) logró la degradación anaerobia en reactores en discontinuo utilizando concentraciones iniciales de acetona inferiores a 1000 mg acetona l⁻¹, con producción de biogás tras un periodo de adaptación de 2 días.

En la Figura 5.2 se presenta el seguimiento de la variación de la producción de biogás (m³ biogás kg⁻¹ DQO_{eliminada}) y de la concentración de ácidos grasos volátiles (mg CH₃COOH l⁻¹) durante la puesta en marcha del reactor. Las bajas cargas orgánicas utilizadas ocasionaron una concentración casi nula de ácidos grasos volátiles durante todo este periodo, excepto para el día 27, a la semana de introducir la acetona en la mezcla de alimento, en el que se determinó una concentración de 189 mg CH₃COOH l⁻¹. Esto se atribuye a un desajuste transitorio entre la producción y el consumo de éstos por la rápida degradación de la acetona, que se realiza mediante una reacción de carboxilación llevada a cabo por los microorganismos acidogénicos, obteniéndose como producto ácido acético.

Las bajas producciones de biogás que se obtienen con eficacias de eliminación inferiores al 90% y con cargas orgánicas bajas no permiten detectar todo el biogás producido debido a la configuración del reactor, causando ratios específicos por unidad de DQO degradada anormalmente pequeños.

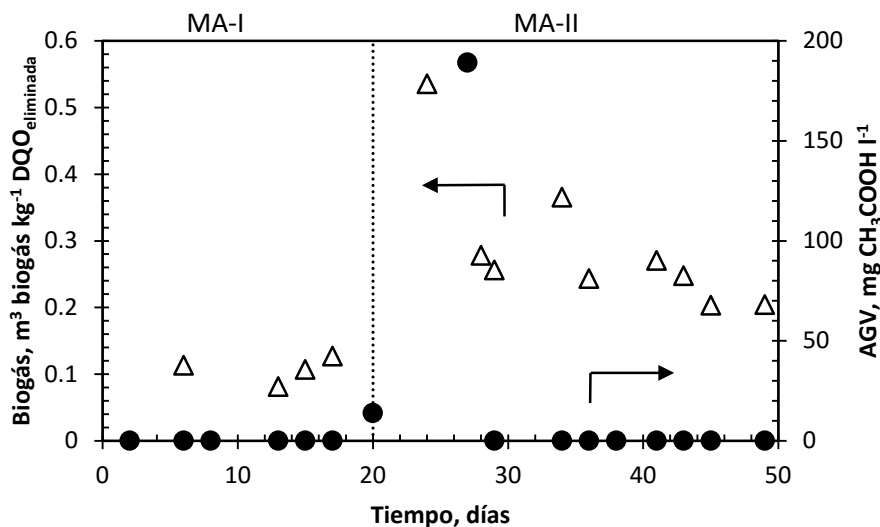


Figura 5.2.- Seguimiento de la evolución de: Δ la producción de biogás y \bullet la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente durante la puesta en marcha de un reactor RALF para la degradación de una mezcla multicomponente de disolventes.

Las elevadas eficacias de eliminación obtenidas para todos los disolventes que componen la mezcla de disolventes del sustrato, así como la estabilidad del reactor atendiendo a la baja concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente y a la producción específica de biogás obtenidas al final de la fase MA-II, indican la adaptación final a la mezcla de disolventes del sistema biológico y, por tanto, el final de la puesta en marcha del reactor.

5.2.2 Influencia de la carga orgánica en la degradación anaerobia de una mezcla de disolventes en un reactor RALF

En la Tabla 5.5 se muestran los resultados obtenidos para la degradación anaerobia de cargas orgánicas crecientes de acetato de etilo en una mezcla multicomponente de disolventes. De los resultados se puede destacar las elevadas eficacias de eliminación alcanzadas, superiores al 97.4% durante todo el experimento, con concentraciones de materia orgánica en el efluente inferiores a 210 mg DQO l⁻¹. Estos resultados corroboran la elevada biodegradabilidad anaerobia de acetato de etilo, incluso con cargas de hasta 40 kg DQO m⁻³ d⁻¹ y que la presencia de otros disolventes en el sustrato no interfiere en su biodegradación.

Tabla 5.5.- Condiciones de operación y eficacias de funcionamiento durante el estudio de la influencia de la carga orgánica de una mezcla de disolventes en el rendimiento del reactor. Valores promedio y su desviación estándar.

	MB-I	MB-II	MB-III	MB-IV	MB-V
Días de operación	50-58	59-63	64-73	74-101	102-115
Temperatura, °C	24.1±0.4	25.0±0.8	24.7±1.4	24.8±0.5	24.9±0.6
V_s , m h ⁻¹	9.1	9.1	9.2	9.2	9.9±1.5
C_e , mg DQO l ⁻¹	7727±1065	7625±812	7549±1130	7779±654	12067±119
C_s , mg DQO l ⁻¹	111±22	70±7	77±38	197±159	210±67
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	10.4±6.2	15.0±1.6	18.9±2.8	29.2±2.5	45.3±0.4
CO Acetato de etilo, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	5.5±3.3	10.2±1.1	14.3±2.1	24.4±2.1	40.3±0.4
EE global, %	98.5±0.5	99.1±0.2	98.9±0.7	97.4±2.2	98.3±0.6
pH	7.3±0.1	7.2	7.1	7.2±0.1	7.2±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	7.4±0.2	7.1±0.1	7.1±0.3	6.5±0.3	6.4±0.9
Potencial redox, mV	-378.6±21.6	-390.5±1.2	-391.9±3.6	-382.7±14.6	-386.4±9.9
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	3619±81	3508	3525±52	3570±145	3248±564
Composición del influente en % en masa					
Acetato de etilo	56.75	71.2	78.4	85.6	90.39
Etanol	24.75	16.5	12.4	8.2	5.5
1-metoxi-2-propanol	6.75	4.5	3.4	2.2	1.5
Isopropanol	6.75	4.5	3.4	2.2	1.5
Acetona	5	3.3	2.5	1.7	1.1

V_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; C_s : concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación

En la Figura 5.3 se presenta la evolución temporal de la carga orgánica ($\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), de la eficacia de eliminación (%) y de la concentración de materia orgánica en el efluente (mg DQO l^{-1}). En la Figura 5.4 se muestra la evolución temporal de la producción específica de metano ($\text{m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$) y de la concentración de ácidos grasos volátiles ($\text{mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$).

En la Figura 5.3 se observa una eficacia de eliminación superior al 97% prácticamente durante todo el experimento, incluso aplicando cargas orgánicas tan elevadas como $45 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. El aumento de la concentración de acetato de etilo al inicio de este experimento a 3 g DQO l^{-1} (MB-I), a la vez que se redujo la presencia del resto de disolventes de la mezcla, no dio lugar a un empeoramiento en la calidad del efluente, ya que se observaron valores similares a los medidos en los últimos días de la puesta en marcha del reactor.

Las bajas concentraciones de materia orgánica en el efluente se mantuvieron durante las primeras cuatro fases de este experimento, a excepción del día 85, en el que se observó un pico de $499 \text{ mg DQO l}^{-1}$. En la última fase, al aplicar una carga orgánica de $40 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ de acetato de etilo, la concentración en el efluente aumentó hasta $240 \text{ mg DQO l}^{-1}$, mostrando los primeros indicios de sobrecarga del reactor. Estos resultados muestran la capacidad de esta tecnología para el tratamiento de elevadas concentraciones de acetato de etilo, superiores a 10 g DQO l^{-1} , en presencia de otros disolventes oxigenados de uso habitual en la formulación de tintas. Esta capacidad de degradación es superior a la descrita en la bibliografía, que fue de 1.8 g DQO l^{-1} en un sistema en discontinuo (Schwartz, 1991).

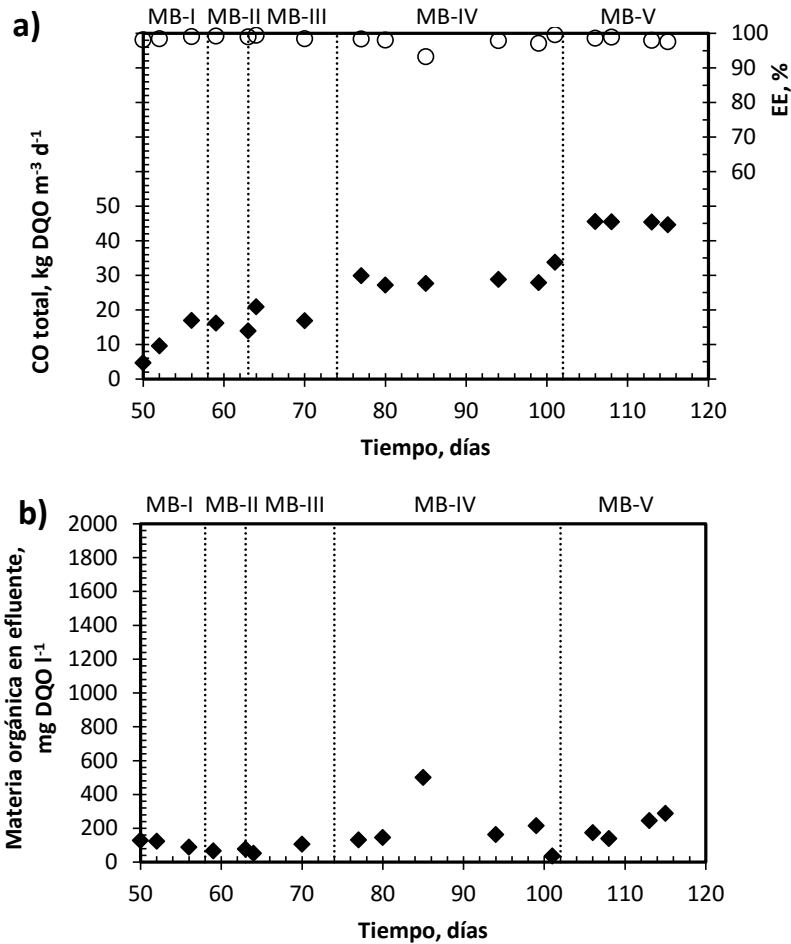


Figura 5.3.- Variación temporal de: a) \blacklozenge carga orgánica y \circ eficacia de eliminación y b) concentración de materia orgánica en el efluente durante el experimento de aumento de la carga orgánica de acetato de etilo.

Con la aplicación sobre el sistema de cargas orgánicas inferiores a $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ no se detectaron ácidos grasos volátiles (Figura 5.4). El aumento de la carga orgánica produjo una leve acumulación de ácidos grasos volátiles debido a un desajuste entre la producción de estos ácidos y el consumo de los mismos por parte de los microorganismos metanogénicos. Al final de los periodos MB-IV y MB-V el sistema tendió a valores inferiores a $100 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$, indicando la buena capacidad del mismo para degradar las elevadas cargas orgánicas aplicadas. El aumento de la cantidad de sustrato disponible en el sistema conllevó que el registro del metano específico producido se encontrara en valores próximos a los

estequiométricos ($0.35 \text{ m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$) en la fase MB-IV. A partir del día 84 (fase MB-IV) y hasta el final del experimento, la producción de metano se estabilizó en valores comprendidos entre 0.296 y $0.357 \text{ m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$. Análogamente a lo observado en la fase MA-I, con cargas orgánicas bajas, se detectaron producciones específicas anormalmente bajas.

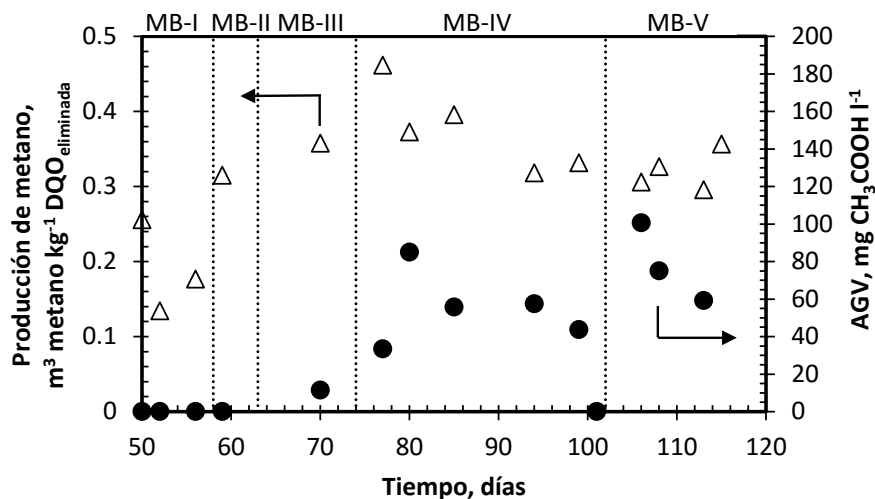


Figura 5.4.- Seguimiento de la evolución de: Δ producción específica de metano y \bullet concentración de ácidos grasos volátiles durante el experimento de aumento de carga orgánica de acetato de etilo.

5.2.3 Influencia del cambio de composición en etanol y acetato de etilo en un reactor RALF con sustrato multicomponente

La Tabla 5.6 recoge los resultados experimentales asociados al funcionamiento del reactor RALF bajo una sustitución progresiva de acetato de etilo por etanol. De estos valores destaca que se mantuvieron unas elevadas eficacias de eliminación globales, superiores al 97%, con una elevada carga orgánica ($45 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) durante todo el experimento, mostrando que el cambio en el compuesto mayoritario en la composición del sustrato, así como las elevadas cargas orgánicas aplicadas no afectaron negativamente al funcionamiento del reactor RALF operado bajo condiciones mesofílicas. La elevada velocidad superficial utilizada en el reactor durante este experimento con el objeto de aumentar la fluidización del lecho no produjo ningún cambio notorio en el sistema.

Tabla 5.6.- Resultados experimentales obtenidos durante la sustitución de acetato de etilo por etanol como compuesto mayoritario.

	MC-I	MC-II	MC-III
Días de operación	116-125	126-128	129-142
Temperatura, °C	26.1±0.6	27.1±0.5	26.2±1.0
v_s , m h ⁻¹	12.8	12.8	12.8
C_e , mg DQO l ⁻¹	12029±337	11848	11845±189
C_s , mg DQO l ⁻¹	298±3	207	310±31
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	45.1±1.3	44.4	44.4±0.7
CO acetato de etilo, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	29.2±0.8	18.8	9.4±0.2
CO etanol, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	13.8±0.4	23.6	33.1±0.5
EE global, %	97.5±0.1	98.3	97.4±0.3
pH	7.2±0.2	7.3±0.2	7.3±0.2
Conductividad, mS cm ⁻¹	6.2±0.2	6.3	6.6±0.5
Potencial redox, mV	-382.5±6.9	-392.5±3.6	-392.6±1.7
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	3497±89	3554	3484±61
Composición del influente en % en masa			
Acetato de etilo	68.2	45.9	23.7
Etanol	27.7	49.9	72.2
1-metoxi-2-propanol	1.5	1.5	1.5
Isopropanol	1.5	1.5	1.5
Acetona	1.1	1.1	1.1

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; C_s : concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación

En la Figura 5.5 se representa la variación temporal de a) la carga orgánica (kg DQO m⁻³ d⁻¹) y la eficacia de eliminación (%) y b) la concentración de materia orgánica en el efluente (mg DQO l⁻¹) para este ensayo. La elevada eficacia de eliminación desde el principio, a pesar de la elevada carga orgánica, indica la buena capacidad de los microorganismos anaerobios para adaptarse a una sustitución rápida de un disolvente muy biodegradable por otro que no lo es. Estos resultados muestran que la degradación de etanol no se vio afectada por una elevada concentración de acetato de etilo en el reactor o por la presencia en la mezcla de otros compuestos en menores concentraciones como fueron 1-metoxi-2-propanol, isopropanol y acetona. El cambio en la composición del sustrato coincidió con un ligero aumento en la concentración de materia orgánica en el efluente, sin influencia apreciable en la eficacia de eliminación.

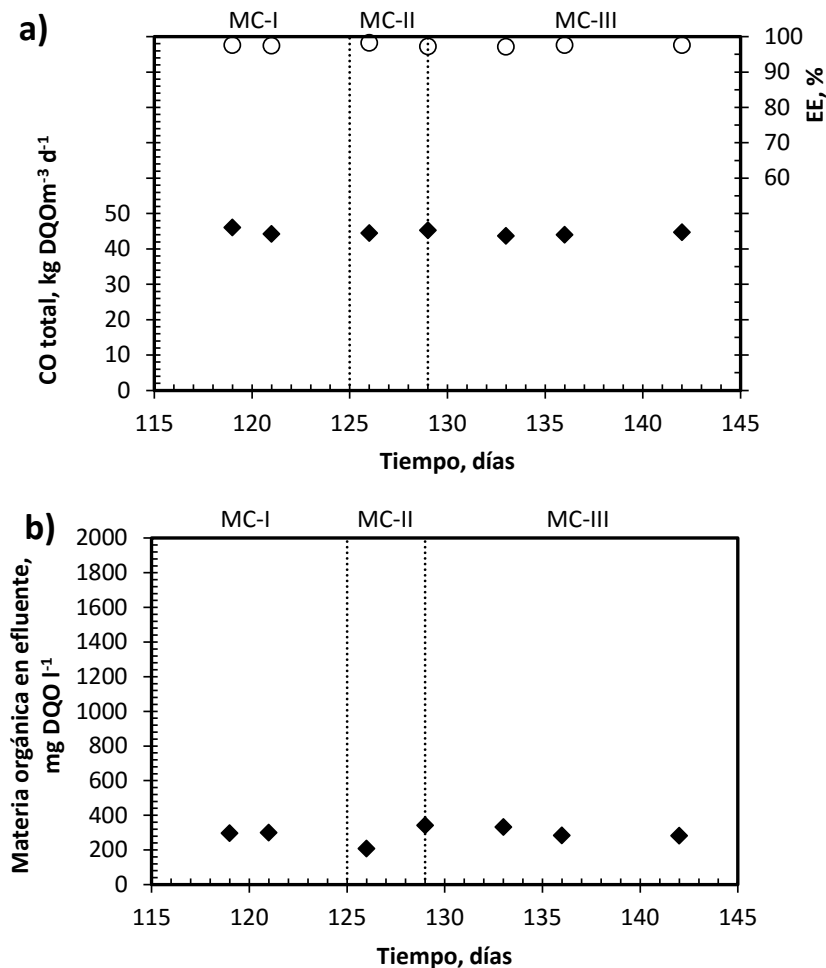


Figura 5.5.- Variación temporal de: a) \blacklozenge carga orgánica total y \circ la eficacia de eliminación total y b) concentración de materia orgánica en el efluente durante la sustitución de acetato de etilo por etanol como compuesto mayoritario en una mezcla de disolventes a depurar.

En la Figura 5.6 se presenta el seguimiento de la variación de la producción específica de metano (m^3 metano kg^{-1} DQO_{eliminada}) y de la concentración de ácidos grasos volátiles (mg CH_3COOH l^{-1}). El cambio en la composición del sustrato produjo un aumento repentino en la concentración de ácidos grasos volátiles en el reactor, alcanzando concentraciones superiores a 200 mg CH_3COOH l^{-1} . Este incremento fue debido a la mayor velocidad de hidrólisis de etanol, aumentando la disponibilidad de ácidos grasos volátiles para los microorganismos metanogénicos acetotrofos. Este hecho ha sido también observado por Vermorel *et al.* (2015) en

ensayos en discontinuo en los que se obtuvieron, con una mezcla de etanol y acetato de etilo, la degradación completa de etanol en menos de 35.8 horas, mientras que la degradación del acetato de etilo necesitó de un periodo previo a su degradación completa hasta metano de 20 horas. La baja velocidad de crecimiento de los microorganismos metanogénicos en comparación con los acidogénicos provocó la acumulación de ácidos grasos volátiles en el reactor, los cuales disminuyeron ligeramente hacia el final del experimento. Por otro lado, la producción específica de metano se mantuvo estable en valores comprendidos entre 0.3 y $0.4 \text{ m}^3 \text{ metano kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{eliminada}}$. Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos en el ensayo anterior, indicando una mejor desgasificación de los gránulos al operar a una mayor velocidad superficial.

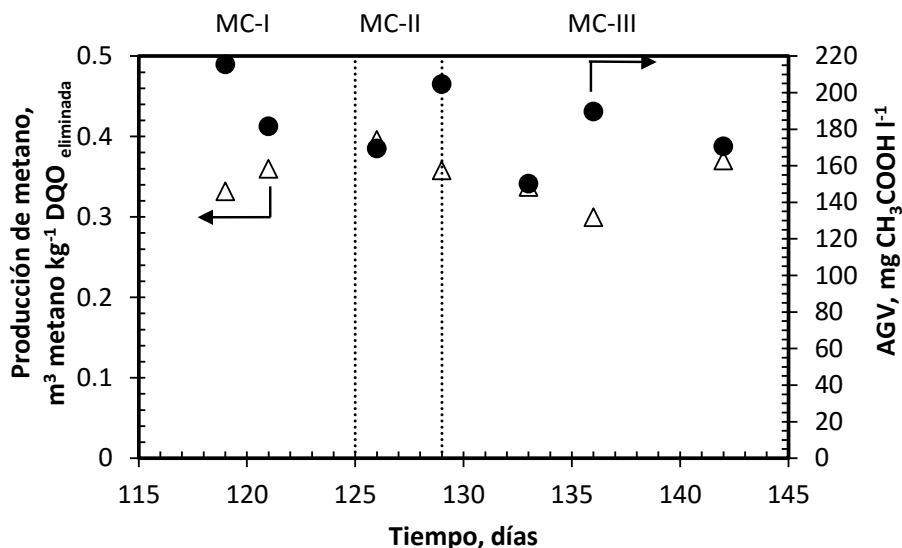


Figura 5.6.- Seguimiento de la evolución de: Δ la producción específica de metano y \bullet la concentración de ácidos grasos volátiles durante la sustitución de acetato de etilo por etanol como compuesto mayoritario en la mezcla de disolventes a depurar.

5.3 CONCLUSIONES

En este capítulo se han presentados los resultados relativos al tratamiento de un agua residual sintética con una mezcla de disolventes compuesta por acetato de etilo, etanol, 1-metoxi-2-propanol, isopropanol y acetona, que simula la

composición de un agua residual procedente del uso de tintas. Este estudio se ha realizado en un reactor RALF a escala de laboratorio operado bajo condiciones mesofílicas de 25 °C. Las conclusiones que se pueden extraer a partir de los resultados obtenidos se exponen a continuación.

Durante la puesta en marcha del reactor RALF, trabajando con una carga orgánica baja de 5 kg DQO m⁻³ d⁻¹, la degradación de etanol y acetato de etilo se produjo desde el primer día, pero para la degradación completa de 1-metoxi-2-propanol e isopropanol fueron necesarios 41 días de operación. La introducción de acetona en el sustrato provocó un aumento en la concentración de ácidos grasos volátiles asociado a su rápida degradación por parte de los microorganismos acidogénicos, produciéndose la degradación de este compuesto en un tiempo inferior a 7 días.

La aplicación de cargas orgánicas crecientes de acetato de etilo a lo largo de 2 meses señalan la elevada biodegradabilidad en condiciones anaerobias de este compuesto en presencia de otros disolventes habituales de la industria flexográfica, llegando a degradar una concentración de acetato de etilo superior a 10 g DQO l⁻¹ en presencia de una mezcla que contienen etanol (750 mg DQO l⁻¹), 1-metoxi-2-propanol (200 mg DQO l⁻¹), isopropanol (240 mg DQO l⁻¹) y acetona (160 mg DQO l⁻¹).

El cambio del acetato de etilo por etanol como compuesto mayoritario en la mezcla no afectó a la eficacia global del proceso, mostrando la fácil y rápida degradación de ambas sustancias. Únicamente se detectó un ligero aumento en la concentración de ácidos grasos volátiles debido a la mayor velocidad de degradación hasta ácido acético de etanol en comparación con acetato de etilo.

Esta tecnología se ha mostrado eficaz para el tratamiento a temperatura ambiente de un agua residual con diferentes mezclas de disolventes que se pueden dar en la industria flexográfica, utilizando como disolventes mayoritarios etanol o acetato de etilo. Estos resultados revelan que en la aplicación industrial de esta tecnología se pueden tratar diferentes mezclas de disolventes utilizadas en función de las necesidades de producción de la industria flexográfica, siempre y cuando se apliquen cargas orgánicas bajas de aquellos disolventes que precisan de un tiempo de adaptación previo a su degradación, como son 1-metoxi-2-propanol e isopropanol.

6 POTENCIACIÓN DE LA GRANULACIÓN MEDIANTE EL USO DE FLOCULANTES: ALUMINIO Y CHITOSAN

El fango granular es característico de reactores tipo RALF y durante la operación de éstos se puede producir la desgranulación de la biomasa debido a la baja concentración del sustrato (Liu *et al.*, 2008), a la sobrecarga del reactor (Kalyuzhnyi *et al.*, 1996) o a la composición del sustrato (Aiyuk y Verstraete, 2004). En el estudio desarrollado en el Capítulo 4, las elevadas cargas orgánicas utilizadas produjeron el desacoplamiento de la cinética entre productores y consumidores de ácidos grasos volátiles, que se produce en situaciones de estrés (Ahring *et al.*, 1995). La acumulación de éstos puede producir la inhibición de la metanogénesis e incluso la lisis de los microorganismos encargada de ésta (Lin *et al.*, 2008), provocando la desintegración del gránulo. La pérdida de la morfología granular de la biomasa provoca que se produzca una mayor pérdida de los microorganismos por lavado, lo que conlleva un descenso en el rendimiento del reactor (Aiyuk *et al.*, 2006).

La desgranulación de la biomasa puede resultar en la expansión del lecho, lo que incrementa el riesgo de lavado y su consiguiente pérdida y necesidad de reposición, lo que conlleva un largo periodo de tiempo necesario para la granulación de un inóculo anaerobio procedente de un cultivo en suspensión o bien, un coste elevado asociado a la sustitución de la biomasa granular. A ello hay que sumar el tiempo de adaptación necesario para la degradación de algunos de los disolventes presentes en el agua residual. Con el fin de evitar estos inconvenientes, en el presente capítulo se estudia la posibilidad de utilizar dos floculantes, aluminio o chitosan, para favorecer la formación de los flóculos que potencian la granulación y la adhesión de los microorganismos al flóculo. Ambos floculantes aparecen descritos en la bibliografía (Abbasi *et al.*, 2013; Elmamouni *et al.*, 1998) como reactivos eficaces para acortar el tiempo necesario para obtener un morfología granular a partir de un cultivo en suspensión. El ensayo realizado con aluminio fue un estudio que permitió sentar las bases procedimentales que después se aplicaron en el estudio sistemático de la granulación de una biomasa parcialmente desgranulada con adición de chitosan.

6.1 PLAN DE TRABAJO

Con el fin de determinar la capacidad de los dos floculantes seleccionados para favorecer la granulación del fango anaerobio, se evaluó la operación con las diferentes estrategias de potenciación de la granulación en los reactores RALF de laboratorio con biomasa parcialmente desgranulada. En el caso del estudio con

chitosan se llevó a cabo una etapa previa en la que se determinó la dosis a añadir de este polímero mediante un ensayo de jar-test.

6.1.1 Aluminio

El uso de aluminio se llevó a cabo al final del experimento de depuración anaerobia de la mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol (Capítulo 4), en el que se produjo la degranulación de la biomasa. El ensayo se realizó con ambos reactores RALF a 18 y 25 °C. El aluminio se dosificó con la alimentación al reactor con una concentración de 300 mg Al³⁺ l⁻¹, concentración propuesta por Boonsawang *et al.* (2008), Yu *et al.* (2001) y Abbasi *et al.* (2013), y se preparó a partir de la solución comercial de policlorosulfato de aluminio Kemira PAX-40 (Kemira Ibérica, España), que contiene una concentración de Al³⁺ del 5±0.2 % y de Al₂O₃ del 9.5±0.3%. En un primer paso, se redujo la velocidad superficial en 0.2 m h⁻¹ (bomba de recirculación apagada) y se mantuvo durante todo el estudio con el objetivo de favorecer la granulación de la biomasa.

6.1.1.1 Operación de los reactores RALF

Con el fin de investigar las condiciones de operación adecuadas para favorecer de nuevo la granulación de la biomasa, se utilizó el fango que se desgranuló parcialmente al finalizar el estudio descrito en la sección 4.2.5, por lo que ambos reactores, RALF 1 (18 °C) y RALF 2 (25 °C), presentaron un grado elevado de flóculos grandes muy porosos y cierta cantidad de biomasa desfloculada. Se redujo la carga orgánica en ambos reactores a 10 kg DQO m⁻³ d⁻¹ y se siguieron dos estrategias de forma secuencial: en primer lugar se redujo la velocidad superficial a 0.2 m h⁻¹ (bomba de recirculación apagada) con el fin de potenciar la regranulación del fango y luego, en el día 17 de la operación, se adicionaron 300 mg Al³⁺ l⁻¹ en el reactor RALF 1, en una segunda fase para potenciar la formación del gránulo. El reactor RALF 2 se usó como referencia, por lo que continuó sin adición de aluminio. Se utilizó un alimento compuesto por etanol como único sustrato.

Tabla 6.1.- Condiciones de operación de los reactores RALF con y sin adición de aluminio.

	RALF 1	RALF 2
	Con Al³⁺	Sin Al³⁺
C _e , g DQO l ⁻¹	2.5	2.5
v _s , m h ⁻¹	0.2	0.2
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	10	10
Aluminio, mg Al ³⁺ l ⁻¹	300	-

C_e: concentración influente; v_s: velocidad superficial; CO: carga orgánica

6.1.2 Chitosan

Este estudio se realizó en dos reactores RALF operados a 25 °C, utilizando como inóculo fango parcialmente desgranulado al final de la experimentación descrita en el Capítulo 4. En este estudio se mezclaron la biomasa proveniente de ambos reactores con el fin de obtener una muestra homogénea. La adición de chitosan se realizó en una sola dosis al principio del experimento, utilizando la concentración determinada en un ensayo de jar-test.

6.1.2.1 Ensayo jar-test

La determinación de la dosis a adicionar de chitosan se realizó mediante un ensayo de jar-test utilizando las concentraciones que se indican en la Tabla 6.2, seleccionadas a partir de la concentración típica en bibliografía, que es de 2 mg g⁻¹ SS (Khemkhao *et al.*, 2011; Lertsittichai *et al.*, 2007). Para ello se empleó una dilución 1:6 del fango parcialmente desgranulado de los reactores RALF. Se estableció un procedimiento para la mezcla y posterior agregación de la biomasa que consistió en una agitación fuerte (190 rpm) durante 2 minutos con el fin de favorecer la mezcla homogénea de los reactivos, seguida de una agitación suave (30 rpm) durante 30 minutos para favorecer la floculación. Al final del ensayo se seleccionó la dosis óptima a partir de los resultados obtenidos en la determinación del índice volumétrico de fangos (IVF), de la turbidez y del tamaño de partícula.

Tabla 6.2.- Concentraciones de quitosán utilizadas en el ensayo jar-test.

Número de vaso	Concentración de quitosán, mg g ⁻¹ SS
1	0
2	1
3	2
4	4
5	8
6	12
7	24

6.1.2.2 Operación de reactores RALF

En este estudio se emplearon dos reactores operados a 25 °C que se inocularon con 1.6 litros de biomasa parcialmente desgranulada. El ensayo consistió en el estudio comparativo del proceso de granulación de un reactor al que se le aplicó quitosán al comienzo del estudio y otro sin quitosán, utilizado como referencia. La operación de los reactores se dividió en tres fases en función de la velocidad superficial y de la carga orgánica aplicada, según lo que se muestra en la Tabla 6.3. Se utilizó un sustrato compuesto por una mezcla binaria de etanol y 1-metoxi-2-propanol con una relación en masa 4:1.

El seguimiento de la evolución de la granulación del fango de los reactores se realizó a diario mediante la medición de la altura del lecho ocupada por los gránulos y de la altura total del lecho ocupado por la biomasa. Además, con el fin de determinar la variación temporal de las características del fango, se tomó muestra de forma periódica a las alturas de lecho de 21.5 y 52 cm y así determinar la velocidad de sedimentación, el índice volumétrico de fangos, la concentración de sólidos suspendidos, el porcentaje de sólidos suspendidos volátiles y el tamaño de partícula.

Tabla 6.3.- Condiciones de operación de los reactores RALF sin y con adición de quitosan.

	G-I	G-II	G-III
Reactor sin quitosan (RAFL 1)			
Temperatura, °C	18	18	18
v_s , m h ⁻¹	0.2-0.5	0.8	9.2
C_e , g DQO l ⁻¹	1.2-4	6	5
C_e M2P, g DQO l ⁻¹	0.3-0.8	1.2	1.1
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	15	25	25
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	3.5	5.8	5.8
Reactor con quitosan (RAFL 2)			
Temperatura, °C	25	25	25
v_s , m h ⁻¹	0.2-0.5	0.8	9.2
C_e , g DQO l ⁻¹	1.2-4	6	5
C_e M2P, g DQO l ⁻¹	0.3-0.8	1.2	1.1
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	15	25	25
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	3.5	5.8	5.8

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; CO: carga orgánica; M2P: 1-metoxi-2-propanol

El seguimiento del rendimiento de los reactores se realizó 2 veces por semana a partir de la eficacia de eliminación de los disolventes de la mezcla, de la concentración de ácidos grasos volátiles y de la producción de metano. También se determinaron la concentración de sólidos suspendidos, sólidos suspendidos volátiles y la turbidez en el efluente.

6.1.2.3 *Estudio del potencial bioquímico del metano y de la actividad metanogénica específica*

En este ensayo se determinó la actividad metanogénica del fango inóculo con y sin adición de quitosan y la de la biomasa proveniente de los reactores al final de la operación. Se adicionaron 2.5 g DQO l⁻¹ de la mezcla binaria de disolventes, se añadió bicarbonato sódico (5 g l⁻¹) para regular el pH y se emplearon la concentración de macro y micronutrientes indicadas en la Tabla 3.6 (Capítulo 3).

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1 Aluminio

En los apartados siguientes se recogen los resultados correspondientes a los experimentos con y sin adición de aluminio. En cuanto a su efecto sobre el desarrollo del gránulo se evaluó la evolución del tamaño y su distribución a lo largo de todo el experimento, así como la influencia de éstos sobre el funcionamiento del reactor.

6.2.1.1 Evolución del tamaño del gránulo

En la Figura 6.1 se muestra la evolución de la concentración de sólidos suspendidos (g l^{-1}) en el interior de ambos reactores objeto de estudio. La reducción de la velocidad superficial estimuló la sedimentación de la biomasa, produciendo un aumento de la concentración de los sólidos suspendidos en ambos reactores, aunque más importante en el reactor RALF 2. El día 17, en el reactor RALF 1, la concentración de sólidos suspendidos descendió ligeramente, probablemente debido a la pérdida por lavado de la biomasa con una menor capacidad de sedimentación como consecuencia de la adición de aluminio. Un efecto contrario fue descrito por Yu *et al.* (2001), quienes durante la puesta en marcha de un reactor RAFA observaron una mayor concentración de sólidos después de la adición de $300 \text{ mg Al}^{3+} \text{ l}^{-1}$ a un cultivo en suspensión. Después de 69 días de operación tras la adición de aluminio, la concentración de sólidos suspendidos aumentó en un 30% aproximadamente con respecto al valor alcanzado antes de iniciar la adición el día 16. Por otro lado, la concentración de sólidos suspendidos en el reactor operado sin aluminio permaneció estable, indicando que la estrategia del descenso de la velocidad superficial es más efectiva para la retención de los sólidos que la combinación de baja velocidad superficial y adición de aluminio.

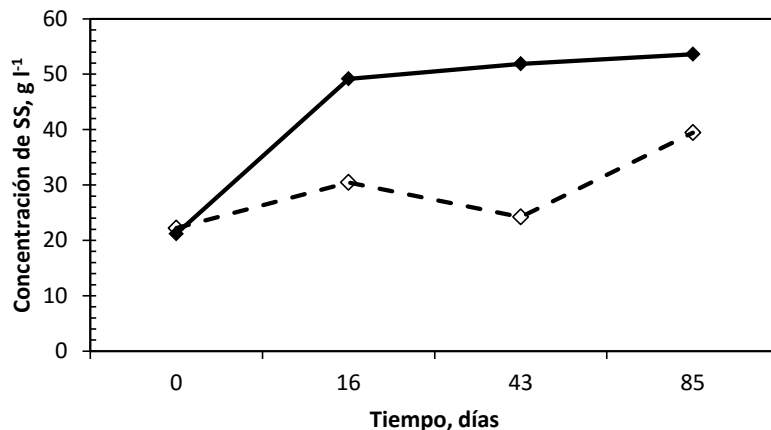


Figura 6.1.- Evolución de la concentración de sólidos suspendidos en: \diamond reactor con adición de aluminio (RALF 1) y \blacklozenge reactor sin adición de aluminio (RALF 2).

La distribución del tamaño de partícula en los dos reactores en función del porcentaje de sólidos suspendidos (%) para cada una de las luces de malla de los tamices utilizados se presenta en la Figura 6.2. Después de la desgranulación en ambos reactores se observó una distribución del tamaño de partícula similar en ambos, con un porcentaje en sólidos suspendidos superior al 60%, correspondiente a partículas con un diámetro mayor a 1 mm, y con más de un 25% de los sólidos suspendidos formados por partículas con un tamaño inferior a 500 μm de diámetro. El descenso de la velocidad superficial produjo la recuperación del tamaño de partícula en los primeros 16 días de operación en el reactor operado sin adición de aluminio, con un tamaño de partícula superior a 1 mm de diámetro en el 90% de los sólidos suspendidos. Esta distribución del tamaño de partícula se mantuvo similar hasta el final del experimento, siendo estos datos coherentes con la evolución de la concentración de sólidos suspendidos en el reactor. Por otro lado, en el reactor RALF 1 sólo se observó un ligero aumento de los sólidos de la fracción entre 1 y 2 mm de diámetro, mientras que el 20% de las partículas continúan siendo inferiores a 500 μm de diámetro al disminuir la velocidad superficial. Tras 27 días de la adición de aluminio (día 43), se observó una distribución del tamaño de partícula similar a la obtenida en el reactor sin aluminio, más del 75% de los sólidos suspendidos tenían un diámetro superior a un 1 mm. Estos resultados muestran que la adición de aluminio no mejora el proceso de granulación de una biomasa parcialmente desgranulada, siendo la reducción de la velocidad superficial la estrategia más eficaz para la recuperación de la

morfología granular, encontrándose en contraposición con los resultados presentados por Boonsawang *et al.* (2008), Yu *et al.* (2001) y Abbasi *et al.* (2013) en reactores RAFA utilizando un cultivo en suspensión. Esta diferencia puede deberse al tipo de inóculo empleado en este estudio. En el caso de los estudios previos, la adición de floculante modifica las fuerzas electroestáticas repulsivas entre los microorganismos, favoreciendo la formación de gránulos; mientras que en este estudio, al partir de un fango parcialmente granulado en el que estas fuerzas electroestáticas han sido neutralizadas por los polímeros extracelulares producidos por los propios microorganismos (Schmidt y Ahring, 1996), el catión de aluminio puede no jugar un papel relevante en el proceso de granulación.

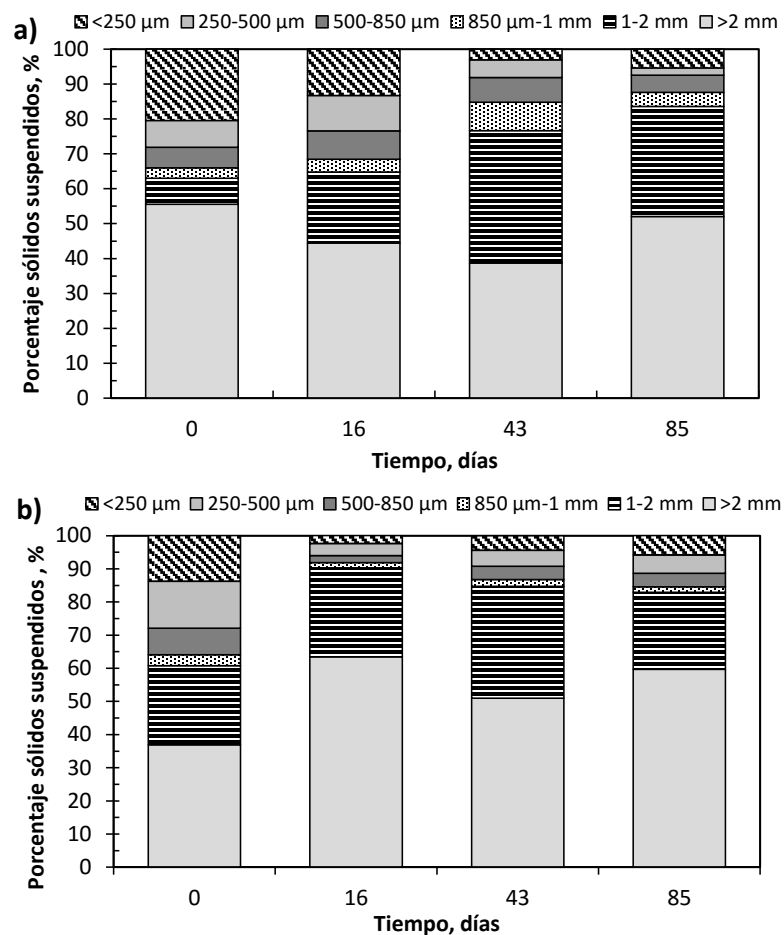


Figura 6.2.- Evolución temporal de la distribución del tamaño de partícula en: a) reactor con adición de aluminio y b) reactor sin adición de aluminio.

6.2.1.2 Evaluación del funcionamiento de los reactores RALF

En la Tabla 6.4 se recoge la información relativa al funcionamiento de ambos reactores a partir de los parámetros experimentales que caracterizan la operación del sistema durante el proceso de granulación con y sin adición de aluminio. Se destaca la elevada eficacia de eliminación en ambos reactores, lo que indica que la adición de aluminio no produjo un efecto adverso sobre la degradación anaerobia de disolventes. Abbasi *et al.* (2013) y Boonsawang *et al.* (2008) tampoco observaron un efecto directo de la adición de aluminio sobre la eficacia del sistema, atribuyendo la mejoría en la eficacia de eliminación de la materia orgánica al elevado tiempo de retención hidráulico y al aumento del tamaño del gránulo. La mayor concentración de sólidos suspendidos medida en el efluente del reactor operado con adición de aluminio corresponde al lavado de la biomasa producido tras el inicio de su adición indicado en la sección anterior.

Tabla 6.4.- Resultados experimentales correspondientes a los reactores RALF con y sin adición de aluminio. Valores promedio y su desviación estándar.

	RALF 1, con adición de Al ³⁺	RALF 2, sin adición de Al ³⁺
Días de operación	0-85	0-85
Temperatura, °C	20.2±1.2	25.1±1.3
v _s , m h ⁻¹	0.2	0.2
C _e , mg DQO l ⁻¹	2538±843	2257±657
C _s , mg DQO l ⁻¹	39±20	21±13
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	10.2±3.4	9.0±2.6
EE global, %	98.4±0.9	99.1±0.6
pH	7.3±0.2	7.5±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	5.9±0.5	5.4±0.2
Potencial redox, mV	-341.2±16.7	-237.6±77.5
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	2545±500	3227±328
SS efluente, mg l ⁻¹	137.3±293.3	56.1±51.6
SSV efluente, mg l ⁻¹	65.7±96.7	43.3±25.1

v_s: velocidad superficial; C_e: concentración influente; C_s: concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación; SS: sólidos suspendidos; SSV: sólidos suspendidos volátiles

En la Figura 6.3 se presenta la evolución temporal de la carga orgánica (kg DQO m⁻³ d⁻¹), la eficacia de eliminación (%) y la producción de metano (m³ metano kg⁻¹ DQO_{eliminada}) para ambos reactores. Se obtuvieron elevadas eficacias de eliminación en los dos reactores al operar con bajas cargas orgánicas durante todo el experimento. Además, la producción específica de metano fue similar en ambos,

mostrando que la adición de aluminio no afecta negativamente a la actividad metanogénica en las condiciones de operación estudiadas.

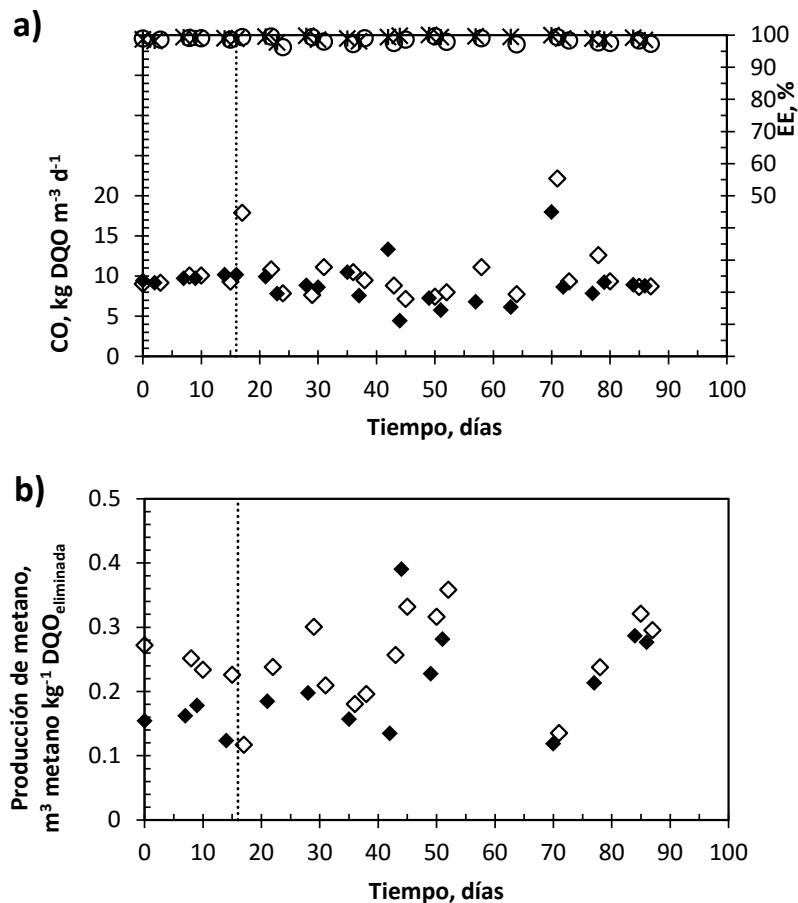


Figura 6.3.- Variación temporal de: a) carga orgánica del reactor \diamond con adición de aluminio y \blacklozenge sin adición de aluminio y \circ la eficacia de eliminación del reactor con adición de aluminio y \circ sin adición de aluminio y b) producción específica de metano del reactor \diamond con adición de aluminio y \blacklozenge sin adición de aluminio.

6.2.2 Chitosan

En los apartados siguientes se recogen los resultados correspondientes a los experimentos con y sin adición de chitosan. En cuanto a su efecto sobre el desarrollo del gránulo, se evaluó en primer lugar la dosis a adicionar en el ensayo

y, posteriormente la evolución de su tamaño y distribución a lo largo de todo el experimento, así como la influencia de éstos sobre el funcionamiento del reactor.

6.2.2.1 Caracterización del fango inicial

En la Tabla 6.5 se muestran los datos relativos a la caracterización del fango empleado para la prueba de chitosan como potenciador de la regranulación. El fango en estudio, que se encontraba parcialmente desgranulado, estaba compuesto por partículas de pequeño tamaño, menores a 1 mm.

Tabla 6.5.- Caracterización del fango utilizado durante la prueba de chitosan.

Parámetro	Valor
Concentración de sólidos suspendidos, g SS l ⁻¹	36.6
Porcentaje de sólidos suspendidos volátiles, %	85.9
Índice volumétrico de fango, ml g ⁻¹ SS	91
Velocidad de sedimentación, cm s ⁻¹	2.9
Tamaño de partícula, μm	
	Percentil 10%
	69.2
	Percentil 50%
	363.1
	Percentil 90%
	955

6.2.2.2 Ensayo jar-test

En la Figura 6.4 se muestra la variación temporal del índice volumétrico de fango (ml g⁻¹) y de la turbidez (UNT) durante el ensayo de jar-test y la distribución del tamaño de partícula de la biomasa al final del ensayo. El índice volumétrico de fango y la turbidez indican que, aunque la adición de una mayor dosis de chitosan mejora ligeramente la turbidez, lleva asociado también un aumento del índice volumétrico de fangos debido a la formación de gránulos porosos de gran tamaño (>1 mm). En cualquier caso, la variación de este parámetro es poco significativo como criterio de selección. Según los resultados obtenidos, dosis tan pequeñas como 1 mg g⁻¹ SS pueden tener un efecto suficientemente positivo, reduciendo eficazmente la turbidez con respecto al blanco sin aumentar apenas el índice volumétrico de fangos. Aun así, se seleccionó una dosis de 8 mg g⁻¹ SS ya que, atendiendo al tamaño de partícula al final del ensayo (Figura 6.4 c), se observó que el efecto del chitosan fue más apreciable con dosis superiores a 8 mg g⁻¹ SS. La capacidad del chitosan para la formación de gránulos radica en que su estructura de polisacárido es parecida a la estructura que presentan los polímeros extracelulares, que son uno de los precursores de la granulación de la biomasa

(Elmamouni *et al.*, 1998). Otros autores utilizaron dosis menores de este polímero, de 2 mg g⁻¹ SS (Lertsittichai *et al.*, 2007; Phalakornkule y Khemkhao, 2010).

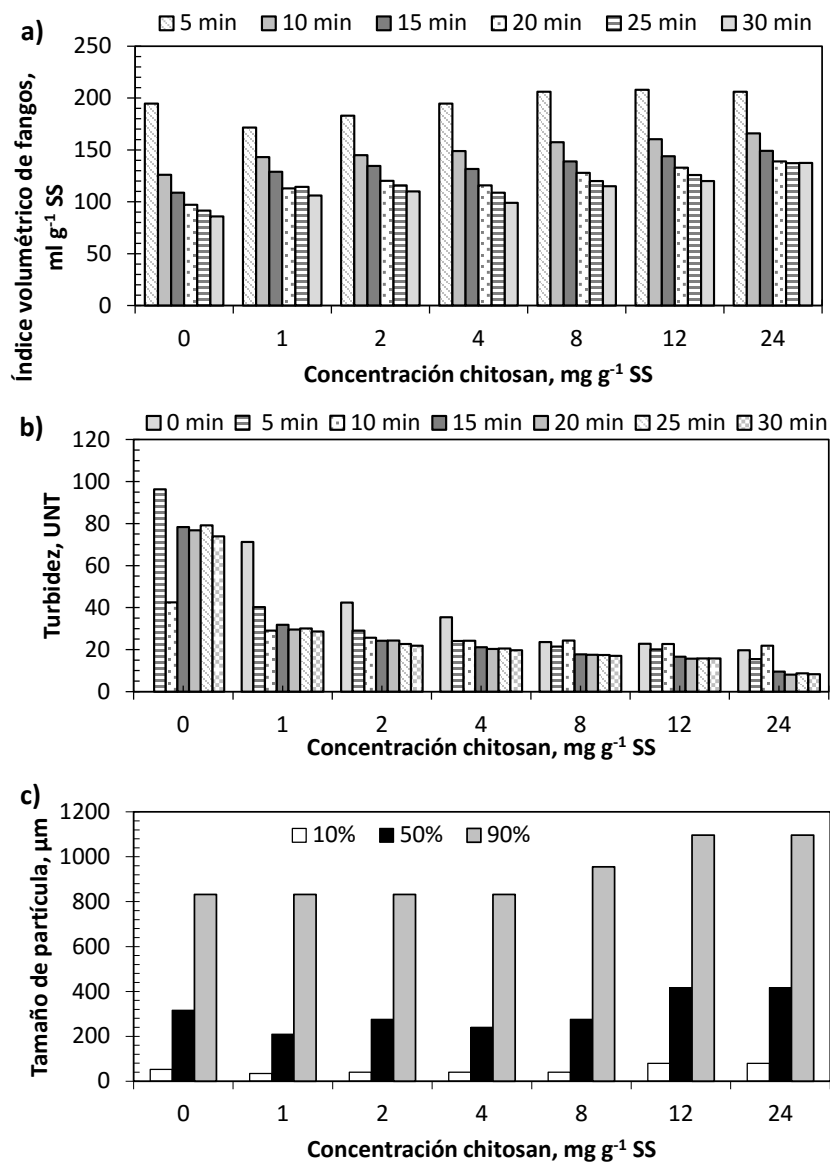


Figura 6.4.- a) Variación temporal del índice volumétrico de fango, b) variación temporal de la turbidez durante el ensayo de jar-test y c) distribución del tamaño de partícula en los percentiles 10, 50 y 90 tras el ensayo de jar-test.

La eficacia del quitosan como floculante en el proceso de formación de gránulos anaerobios depende del pH, de forma que es muy efectivo a bajos valores de pH, pero a valores superiores a 6 su eficacia desciende sensiblemente (Elmamouni *et al.*, 1998). Por ejemplo, Phalakornkule y Khemkhao (2010) obtuvieron con una concentración de quitosan de 2 mg g⁻¹ SS un 5% más de granulación en un medio con un pH 5 que en uno con pH entre 6 y 7. Esto se debe a que con un pH ácido la formación de gránulos se produce por dos mecanismos diferentes: coagulación por la neutralización de las cargas y por floculación por la retención de los sólidos en la red del polímero. Sin embargo, a pH 9 sólo es posible el segundo mecanismo, por lo que únicamente se obtiene granulación con elevadas concentraciones de quitosan (Roussy *et al.*, 2005). En este estudio, tanto el ensayo jar-test como la operación en el reactor se han realizado a pH neutro, entre 7.4 y 7.8.

6.2.2.3 Evolución de la granulación de reactores RALF

Una vez seleccionada la dosis de quitosan a utilizar (8 mg g⁻¹ SS), se adicionó ésta a la biomasa del reactor RALF 2, utilizando el reactor RALF 1, sin quitosan, como blanco.

La observación directa del fango en la columna mostraba dos niveles claramente diferenciados a simple vista, un lecho inferior granulado con partículas de distinto diámetro y una capa superior de partículas finas. En la Figura 6.5 se muestran la altura (cm) ocupada por los gránulos que conforman las partículas de un mayor tamaño, y por el lecho compuesto por toda la biomasa presente en el reactor (cm). El volumen de las partículas de mayor tamaño fue un 26% mayor en el reactor con quitosan al comienzo del experimento, cuando se operó el sistema a baja velocidad superficial, mostrando la elevada capacidad del polímero para favorecer la adhesión de la biomasa en suspensión a la superficie de los gránulos. Probablemente, la presencia de hierro (III) en el influente del reactor como parte de la solución de nutrientes pudo amortiguar los posibles efectos adversos de la operación a pH neutro sobre la granulación con quitosan, tal y como observó Bratskaya *et al.* (2004) en un estudio sobre la floculación de ácidos húmicos. La altura del lecho se redujo en el reactor sin quitosan tras el aumento en la velocidad superficial realizado en el día 14 de la operación (fase G-II) por el lavado de parte de la biomasa, mientras que en el reactor con quitosan se mantuvo estable hasta pasados 60 días desde el inicio de la operación, indicando una mejor capacidad de sedimentación en este reactor. A lo largo de la operación, el volumen de biomasa granulada en el reactor sin quitosan aumentó, alcanzando, tras casi dos meses de

operación, un valor similar al existente en el reactor con quitosán. Al final de la fase G-II, el reactor con quitosán presentó un aumento en el volumen de lecho debido a la pérdida de la biomasa con menor capacidad de sedimentación, sin que por ello se viera afectado el proceso de crecimiento de los gránulos de gran tamaño ya formados.

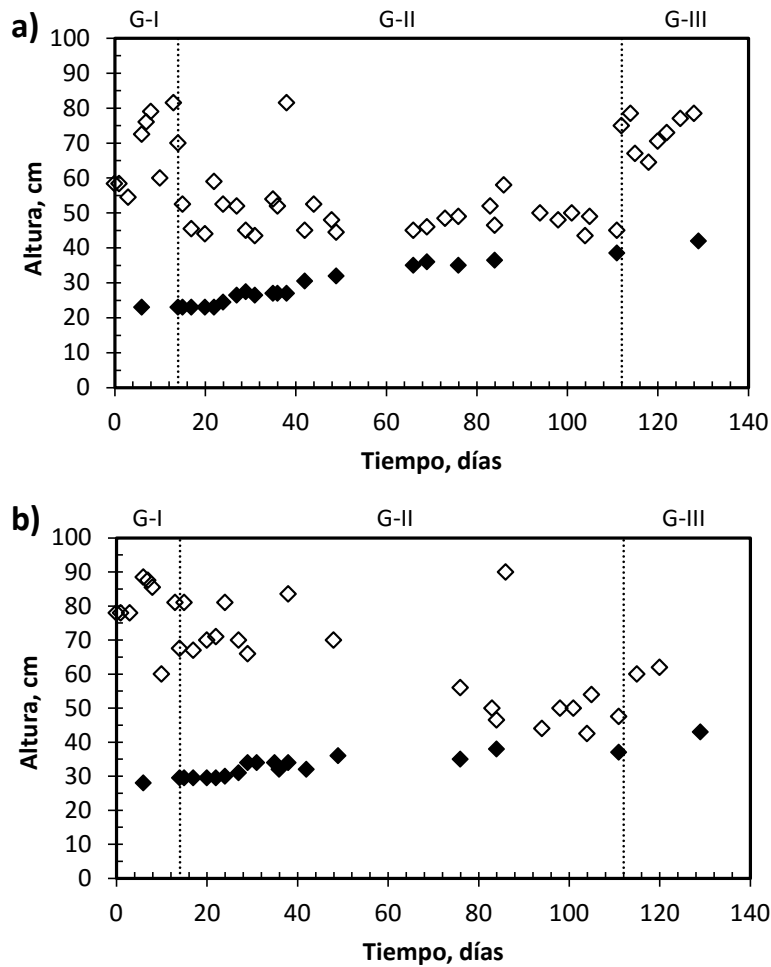


Figura 6.5.- Variación temporal de: \blacklozenge altura en el reactor de gránulos y \diamond altura total de lecho para los reactores a) sin adición de quitosán y b) con adición de quitosán.

En la Figura 6.6 se presentan los resultados de la variación temporal de la velocidad de sedimentación de la biomasa (cm s^{-1}) y del índice volumétrico del fango (ml g^{-1}). Las mayores velocidades de sedimentación se registraron en la

biomasa extraída de la parte inferior de los reactores, tal y como se espera por las características operacionales de los reactores RALF, en los que, como consecuencia del arrastre selectivo de los sólidos, se produce la estratificación del lecho en función de la sedimentabilidad de la biomasa. La adición de quitosan produjo elevadas velocidades de sedimentación en la biomasa de la parte inferior del reactor desde el inicio de la operación, asociadas a la formación de agregados de gran tamaño; sin embargo, fueron necesarios 40 días hasta alcanzar velocidades de sedimentación similares en el reactor sin adición de quitosan por el crecimiento más lento del gránulo. Los sólidos con una menor velocidad de sedimentación, que permanecieron en la zona superior de los reactores, fueron lavados tras el aumento de la velocidad superficial y de la carga orgánica (fase G-II). En la fase G-III se registraron valores similares en todo el lecho en ambos reactores asociado a la expansión de los gránulos de mayor tamaño por el aumento de la velocidad superficial.

De acuerdo con los resultados observados, el índice volumétrico de fango de la biomasa de la zona inferior de los reactores fue ligeramente menor en el reactor con quitosan. Por otro lado, en la parte superior del lecho se produjo el descenso progresivo del índice volumétrico de fango en el reactor control (fase G-II), probablemente inducido por el lavado de la biomasa con menor capacidad de sedimentación. Este fenómeno también se observó en el reactor con adición de quitosan tras el día 60, en el que se redujo el volumen de sólidos por el lavado de la biomasa (Figura 6.5 b). En la fase G-III, al aumentar la velocidad superficial, se produjo el descenso del índice volumétrico de fango en la parte superior del lecho por la expansión de la zona ocupada por los gránulos de gran tamaño. En esta fase final, la operación de ambos reactores mostró la evolución en todo el reactor a valores de índice volumétrico de fango menores a 50 mg g^{-1} , típicos de sistemas granulares (Grady *et al.*, 2011).

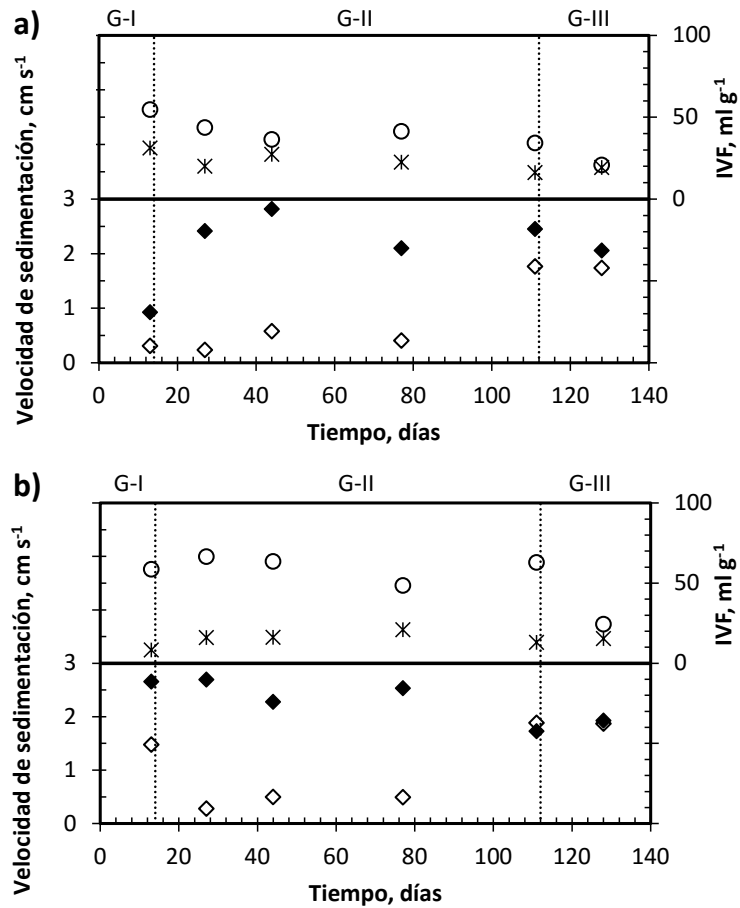


Figura 6.6.- Evolución temporal de la velocidad de sedimentación a una altura de lecho de \blacklozenge 21.5 cm y \diamond 52 cm y del índice volumétrico de fangos a una altura de lecho de \diamond 21.5 cm y \circ 52 cm para a) reactor sin quitosán y b) reactor con quitosán.

En la Figura 6.7 se muestra la evolución temporal de la concentración de sólidos suspendidos (g l^{-1}) y el porcentaje de sólidos suspendidos volátiles (%) en los reactores en las alturas consideradas. La adición de quitosán produce la granulación instantánea de la biomasa, favoreciendo así la retención de sólidos al comienzo de la operación, lo cual se ve reflejado en un valor alto de la concentración de sólidos suspendidos en la primera etapa. Por otro lado, en el reactor de control se produjo la acumulación de biomasa de forma progresiva a lo largo de la etapa G-II debido a que el proceso natural de granulación es más lento, dado que depende de las condiciones de operación que afectan, entre otras cosas,

a la producción de polímeros extracelulares (Zhou *et al.*, 2006). En el inicio de la operación, el contenido mineral de la biomasa fue ligeramente mayor en la zona inferior del lecho, aunque durante la fase G-II se igualaron en ambos reactores, al tiempo que se produjo el lavado de la biomasa con menor capacidad de sedimentación, mostrando así la relación entre la sedimentabilidad y el contenido mineral del fango. La concentración de sólidos suspendidos volátiles obtenida se encuentra dentro de los valores típicos, que varían entre un 10 y un 90% del peso seco de la biomasa en función de las condiciones de operación (Schmidt y Ahring, 1996).

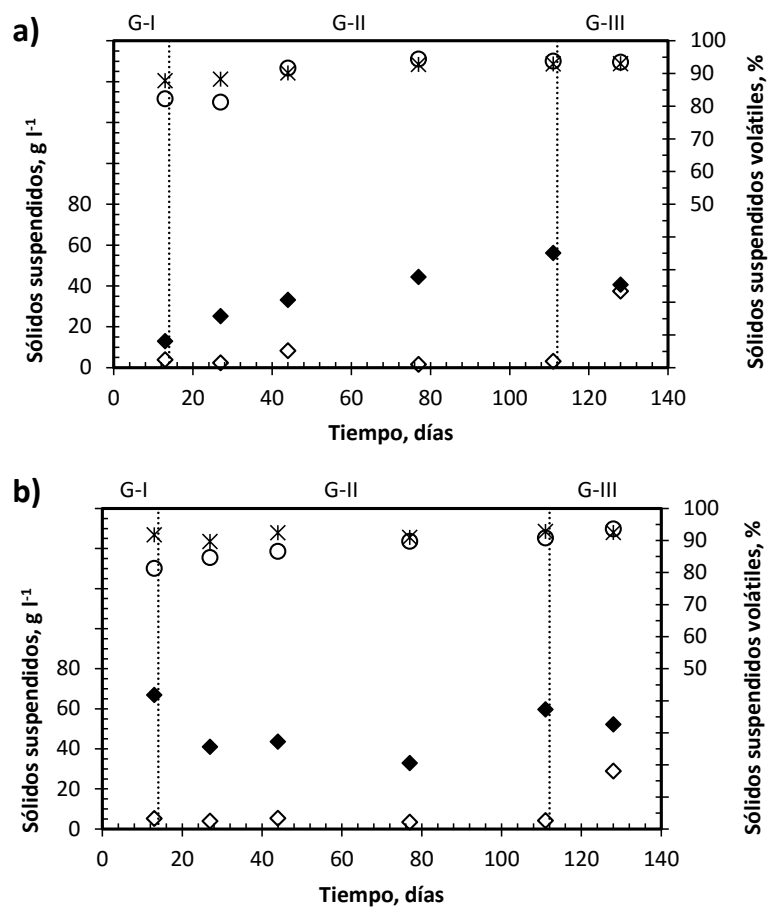


Figura 6.7.- Evolución temporal de la concentración de SS a una altura de lecho de \blacklozenge 21.5 cm y \diamond 52 cm y del porcentaje de SSV a una altura de lecho de \diamond 21.5 cm y \circ 52 cm para a) reactor sin adición de chitosan y b) reactor con adición de chitosan.

En la Figura 6.8 se presenta la variación temporal de la distribución del tamaño de partícula (μm) considerando los percentiles 10, 50 y 90 extraídos de la frecuencia acumulada del tamaño de partícula para la zona inferior del reactor (21.5 cm) y, en la Figura 6.9 la variación temporal del tamaño de partícula (μm) para la zona superior del reactor (52 cm) para ambos reactores. Al comienzo del ensayo, el tamaño del gránulo de la zona inferior del reactor que no contenía quitosan fue ligeramente superior al que se le añadió quitosan (Figura 6.8). Esto pudo ser debido a la separación física de los microorganismos de la superficie del gránulo causada por la agitación durante la aplicación del polímero. La regranulación en el reactor con quitosan se produjo de forma progresiva después de la inoculación, mientras que en el operado sin polímero se observó a partir del día 27, indicando el efecto positivo de la presencia de este polímero durante los primeros días de operación, probablemente debido a que, tal y como postularon Tiwari *et al.* (2005), la interacción entre los polímeros extracelulares y el quitosan favorece la granulación de las poblaciones de acidogénicas. Por otro lado, la disminución de partículas finas observada en el día 27 en ambos reactores pueda deberse al efecto estimulador en la producción de polímeros extracelulares causado por el aumento de la carga orgánica (día 15 de operación), fenómeno observado por otros autores (Zhou *et al.*, 2006). A partir del día 77, se observó la homogeneización en la distribución del tamaño de partícula, alcanzando valores medios superiores a 3 mm en ambos reactores, manteniéndose estable hasta el final de la operación. El tamaño medio de gránulo alcanzado al final del experimento, 3 y 4 mm para los reactores sin y con adición de quitosan respectivamente, se encuentran dentro de los tamaños habituales en reactores RAFA, comprendidos entre 1 y 4 mm (Yan y Tay, 1997). Tiwari *et al.* (2005) obtuvieron un tamaño de partícula de 5 mm de diámetro, similar al obtenido en este estudio, tras 240 días de operación en un reactor RAFA con una biomasa que en origen se encontraba floculada y a la que se le añadió quitosan.

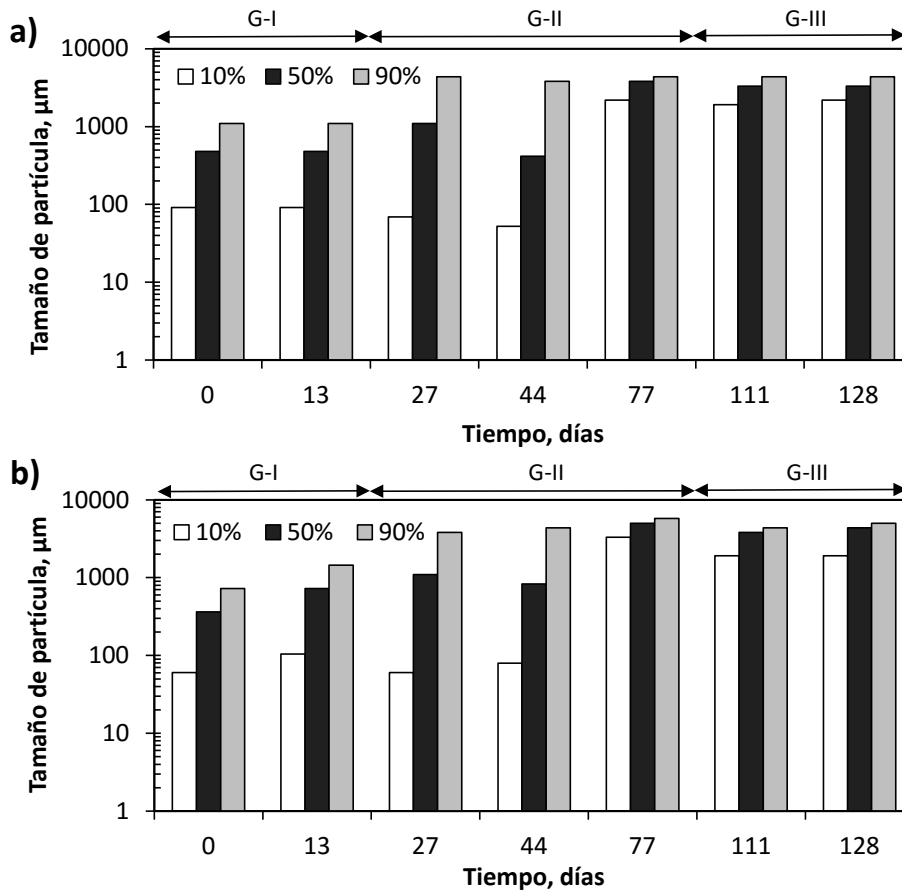


Figura 6.8.- Evolución del tamaño de partícula en la parte inferior del reactor: a) sin adición de chitosan y b) con adición de chitosan.

La distribución del tamaño de partícula en la parte superior de ambos reactores, así como su evolución a lo largo del ensayo no mostró diferencias significativas entre la adición o no de chitosan, con tamaños de partícula menores a los observados en la parte inferior, indicando así la estratificación de la biomasa en el lecho en función de su tamaño (Figura 6.9). El tamaño de partícula se mantuvo en valores similares hasta que se aumentó la velocidad superficial en el día 112 de la operación. Esto produjo la expansión del lecho, con lo que la parte superior del reactor fue ocupada por gránulos de mayor tamaño de la zona inferior del reactor. Atendiendo a la evolución de la distribución del tamaño de partícula en todo el lecho, no se observó una mejora significativa en la granulación en el reactor que contenía chitosan respecto al blanco, indicando que el control de los parámetros de operación, como velocidad superficial y carga orgánica, es más

efectivo para la recuperación del gránulo después de un episodio de desgranulación.

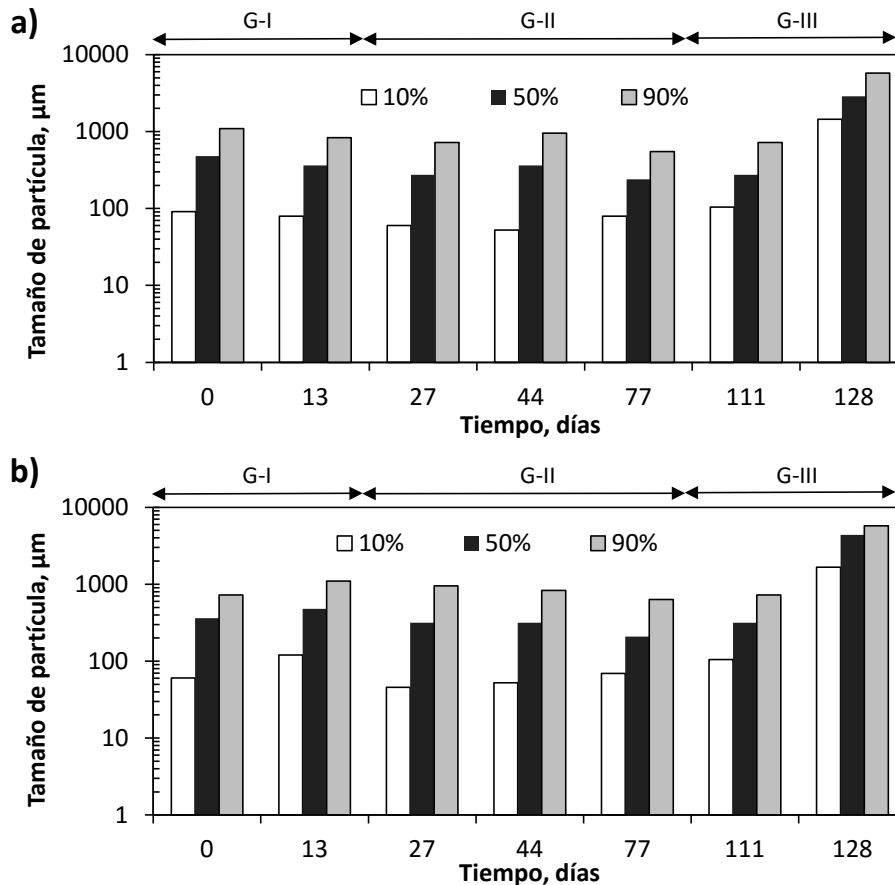


Figura 6.9.- Evolución del tamaño de partícula en la parte superior del reactor: a) sin adición de quitosan y b) con adición de quitosan.

6.2.2.4 Evaluación del funcionamiento de los reactores RALF

En la Tabla 6.6 se muestran los resultados promedio correspondientes al proceso de granulación sin adición y con adición de quitosan para cada una de las etapas en estudio. Se puede destacar que la evolución de la eficacia de eliminación en ambos reactores fue similar. La desviación estándar de este parámetro, junto con la evolución de la distribución de partícula en ambos reactores expuesta anteriormente, muestran que el aumento del tamaño del gránulo no afecta a la eficacia de eliminación, pero sí que favorece la estabilización del proceso, tal y

como se observa por la reducción de la desviación estándar en la eficacia de eliminación. Esto también fue observado por Tiwari *et al.* (2005).

Tabla 6.6.- Resultados experimentales correspondientes a los reactores RALF sin y con adición de quitosán. Valores promedio y su desviación estándar.

	G-I	G-II	G-III
	Reactor sin quitosán (RALF 1)		
Días de operación	0-14	15-111	112-130
Temperatura, °C	24.6±0.9	24.1±1.0	24.6±0.7
v_s , m h ⁻¹	0.4±0.1	0.8±0.1	9.2
C_e , mg DQO l ⁻¹	2192±1288	5934±1073	4736±331
C_s , mg DQO l ⁻¹	519±196	260±321	53±18
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	14.5±5.8	36.5±8.3	31.7±2.2
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	3.1±1.2	7.7±1.7	6.7±0.5
EE global, %	87.3±16.4	98.8±3.3	99.8±0.5
EE M2P, %	32.9±20.7	95.4±7.5	96.5±2.5
pH	7.7±0.2	7.4±0.1	7.5±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	5.0±0.1	5.0±0.2	5.0±0.1
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	3228±74.7	3103±185.9	3133±50
Turbidez, NTU	45.1±8.8	36.3±23.5	13.2±6.6
SS, mg l ⁻¹	39.7±17.1	31.3±33.8	16.6±9.3
	Reactor con quitosán (RALF 2)		
Días de operación	0-14	15-111	112-130
Temperatura, °C	24.6±0.9	24.4±0.9	24.8±0.6
v_s , m h ⁻¹	0.4±0.1	0.8±0.1	9.2
C_e , mg DQO l ⁻¹	2064±1228	6222±1282	5169±497
C_s , mg DQO l ⁻¹	441±237	206±220	55±22
CO, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	13.9±5.8	28.7±8.9	26.8±3.1
CO M2P, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	2.9±1.2	6.0±1.9	5.6±0.7
EE global, %	90.2±11.2	98.9±3.2	99.8±0.5
EE M2P, %	26.8±24.5	93.9±17.0	96.7±2.5
pH	7.8±0.1	7.4±0.1	7.5±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	5.0±0.1	5.1±0.2	5.0±0.1
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	3287±81	3123±184	3169±42
Turbidez, NTU	36.2±32.7	35.8±25.0	13.8±5.4
SS, mg l ⁻¹	21.5±10.3	21.9±15.2	20.0±15.1

v_s : velocidad superficial; C_e : concentración influente; C_s : concentración efluente; CO: carga orgánica; EE: eficacia de eliminación; M2P: 1-metoxi-2-propanol

En la Figura 6.10 se muestran las cargas orgánicas globales y de 1-metoxi-2-propanol aplicadas (kg DQO m⁻³ d⁻¹) y las eficacias de eliminación global y de 1-

metoxi-2-propanol (%) para ambos reactores. Como se ha indicado anteriormente, debido a la complejidad de la ruta metabólica de la degradación de 1-metoxi-2-propanol, se requiere un tiempo de adaptación para la degradación completa de este compuesto de aproximadamente un mes en un reactor operado bajo condiciones mesofílicas de 25 °C. El periodo necesario para alcanzar eficacias de eliminación de este disolvente superiores al 80% se acortó ligeramente en el reactor con quitosán, mostrando un efecto positivo de la retención de sólidos. Al final del experimento se degradaron en ambos reactores cargas orgánicas de 1-metoxi-2-propanol similares a las degradadas en los anteriores experimentos.

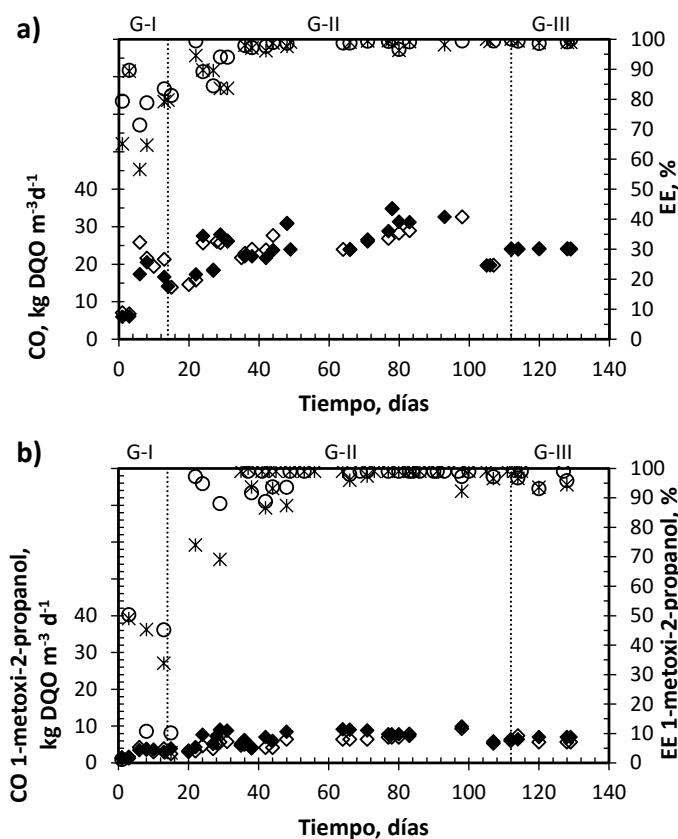


Figura 6.10.- Seguimiento de la variación temporal de: carga orgánica del reactor ◆ sin adición de quitosán y ◇ con adición de quitosán, eficacia de eliminación del reactor ◇ sin adición de quitosán y ○ con adición de quitosán. a) datos globales, b) datos 1-metoxi-2-propanol.

En la Figura 6.11 se presenta la variación de la concentración de materia orgánica de 1-metoxi-2-propanol (mg DQO l⁻¹), de la producción específica de

metano (m^3 metano kg^{-1} DQO_{eliminada}) y de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente ($\text{mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$) para los dos reactores RALF.

Las elevadas eficacias de eliminación de 1-metoxi-2-propanol observadas durante la fase G-II resultaron, obviamente, en una baja concentración de este disolvente en el efluente. En el reactor con quitosan se alcanzaron concentraciones de 1-metoxi-2-propanol menores a $200 \text{ mg DQO l}^{-1}$ en 22 días, mientras que sin quitosan fueron necesarios 38 días para la completa adaptación de la biomasa a este disolvente. El aumento de la carga orgánica realizado en el día 14 (fase G-II) produjo un aumento de la concentración de ácidos grasos volátiles que fue disminuyendo progresivamente hasta el día 35, asociado a una descompensación entre la producción de estos ácidos y el consumo por parte de los microorganismos productores de metano. En el reactor con quitosan se produjo una menor acumulación de ácidos grasos volátiles, lo que podría asociarse a una mayor retención de arqueas acetotróficas en el reactor, aunque prácticamente no tuvo efecto en la producción específica de metano, que fue similar para ambos reactores. Similares resultados fueron descritos por Khemkhao *et al.* (2011) que observaron la retención de microorganismos del género *Methanosaeta*, que son metanogénicas acetotrofas, utilizando quitosan como floculante en un reactor RAFA. El aumento de la velocidad superficial en la última fase del experimento (fase G-III) produjo una mayor superficie de contacto entre la biomasa y el sustrato, mejorando la estabilidad del proceso por el equilibrio entre la producción de ácidos grasos volátiles y su consumo en la metanogénesis, tal y como señala la menor concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente de ambos reactores. Los resultados obtenidos en esta sección muestran que la presencia de quitosan en el reactor tiene un efecto ligeramente positivo en el arranque del mismo, al igual que se había observado una fuga inicial de sólidos suspendidos en el efluente menor que en el reactor sin adición del polímero.

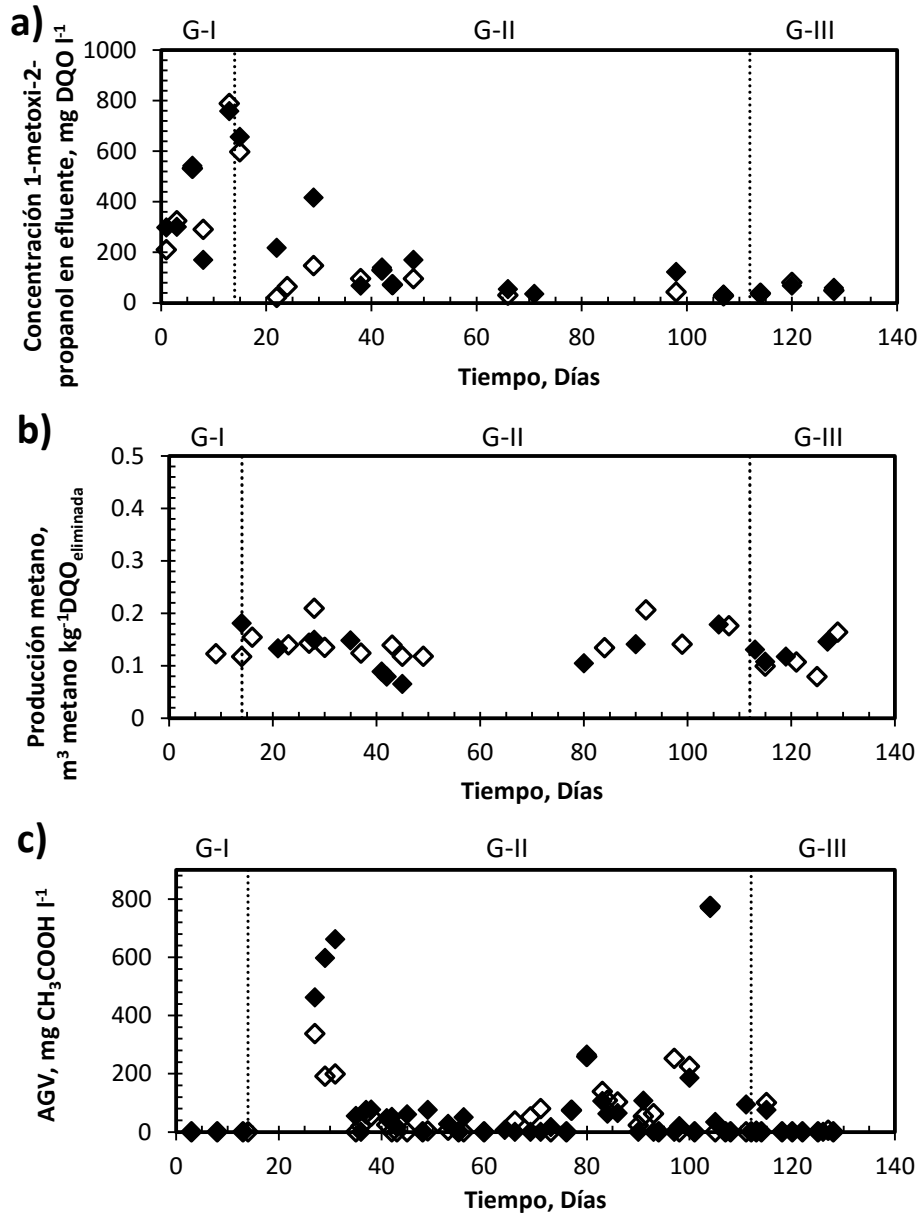


Figura 6.11.-Seguimiento de la variación temporal de los reactores \blacklozenge sin quitosan y \diamond con quitosan de: a) la concentración de materia orgánica en el efluente correspondiente a 1-metoxi-2-propanol, b) producción específica de metano y c) de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente.

6.2.2.5 Estudio de la actividad metanogénica específica y del potencial bioquímico del metano

En la Tabla 6.7 se muestran la actividad metanogénica específica ($\text{ml CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y el potencial bioquímico del metano ($\text{ml CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$) para la biomasa inóculo y la extraída de ambos reactores tras 130 días de operación. Los resultados obtenidos muestran la menor actividad metanogénica del inóculo, con valores significativamente inferiores de AME, así como una menor cinética en la producción de metano de la biomasa con quitosan, indicando una influencia adversa con la adición del polímero, que podría deberse a la agitación aplicada durante su adición o a una reestructuración interna del gránulo que produjo una menor accesibilidad del sustrato para bacterias metanogénicas. Tras 130 días de operación, la actividad metabólica alcanzó elevados valores y similares en ambos reactores, indicando la buena adaptación, de nuevo, a la degradación de 1-metoxi-2-propanol.

Tabla 6.7.- Actividad metanogénica específica (AME) y potencial bioquímico del metano (PBM) para la biomasa inóculo y tras 130 días de operación sin y con quitosan.

	Inóculo		Día 130	
	Sin quitosan	Con quitosan	Sin quitosan	Con quitosan
AME, $\text{ml CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$	195.9±21.7	100.6±33.4	244.8±2.8	259.9±6.9
PBM, $\text{ml CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$	72.8±2.3	66.9±0.6	97.8±4.1	101.8±5.0

En la Figura 6.12 se muestra la evolución del volumen acumulado de metano producido (Nml) del inóculo y la biomasa de los reactores tras 130 días de operación. En la operación con el fango de siembra se observa una única pendiente, sin embargo, tras 130 días de operación, hay una segunda pendiente que puede deberse a la degradación del 1-metoxi-2-propanol, que se produjo a una velocidad menor.

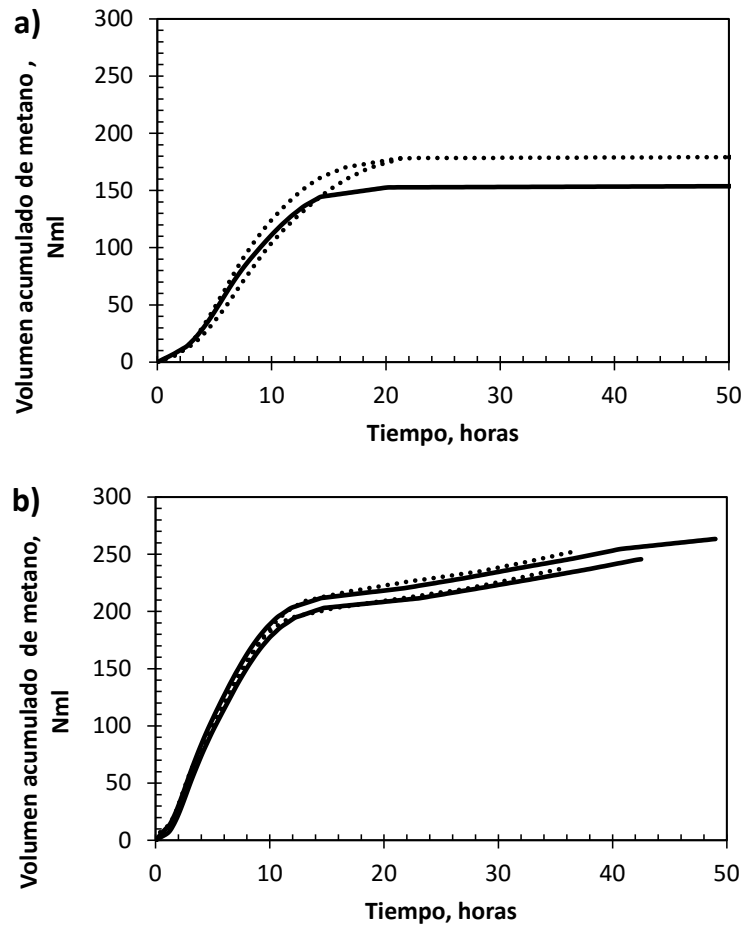


Figura 6.12.- Evolución de la producción de metano para: a) la biomasa inóculo y b) biomasa proveniente de los reactores tras 130 días de operación sin adición de quitosan (línea discontinua) y con adición de quitosan (línea continua).

6.3 CONCLUSIONES

Los experimentos presentados en este capítulo se han centrado en el estudio de diversas estrategias para potenciar la granulación de la biomasa parcialmente desgranulada durante la degradación anaerobia de disolventes operando con elevada carga orgánica y aporte de sustrato intermitente. Las estrategias utilizadas durante este estudio han sido la reducción de la velocidad

superficial y la adición de dos floculantes, un floculante catiónico, como es el aluminio, y un polímero natural, como es el quitosan. Las conclusiones que se pueden extraer a partir de los resultados obtenidos se exponen a continuación.

Este trabajo experimental ha permitido el desarrollo y validación de una metodología experimental para el estudio sistemático del efecto de la adición de floculantes como potenciadores de la granulación sobre la evolución temporal de la granulación en un fango granular parcialmente desgranulado.

Los resultados obtenidos con la adición de aluminio o de quitosan como potenciadores de la granulación muestran que, aunque en la bibliografía se han descrito estos dos floculantes como eficaces para la mejora de la granulación en un cultivo en suspensión, su adición a un fango parcialmente desgranulado no produce una mejoría importante en la morfología granular debido, probablemente, a que los centros de nucleación no desaparecieron totalmente durante el proceso de desgranulación. Por otro lado, el descenso de la velocidad superficial a valores inferiores a 1 m h^{-1} parece ser el factor más importante para la regeneración de la biomasa. Una línea futura de trabajo será la de continuar con este estudio, pero utilizando el polímero natural quitosan en fango anaerobio en suspensión, biomasa de mayor disponibilidad. En este caso, puede que la adición de polímero realice el papel esperado y así contribuir a reducción de los tiempos de espera en la formación de gránulos.

Tampoco se ha observado que la presencia de cualquiera de estos dos floculantes en el reactor produzca algún efecto negativo significativo sobre el rendimiento del sistema para las cargas orgánicas ensayadas, siendo más determinante el tamaño de partícula y el control en las condiciones operacionales para una eficaz degradación de los disolventes.

**7 INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE COBALTO Y TUNGSTENO
EN LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE DISOLVENTES
ORGÁNICOS**

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio de la influencia de la dosificación de cobalto y tungsteno en la degradación anaerobia de fenol en un agua residual con una elevada salinidad. La correcta dosificación de nutrientes juega un papel fundamental a la hora de emplear la tecnología del biolavador para el tratamiento de emisiones en aire procedentes del uso de disolventes, ya que al trabajar con elevados tiempos de retención hidráulico existe el riesgo de que se produzca su acumulación si la dosificación es excesiva. La acumulación de nutrientes puede causar la inhibición del proceso, así como una dosis por debajo de la óptima provocaría una reducción en la actividad de los microorganismos (Lettinga, 1995b). Aunque el fenol no ha sido el disolvente orgánico empleado en los ensayos anteriores, con este trabajo se sientan las bases conceptuales para realizar este tipo de ensayos. Este estudio fue llevado a cabo durante una estancia de 3 meses en la Delft University of Technology bajo la supervisión del profesor Dr. Henri Spanjers y me permite la obtención de la Mención Internacional en el título de Doctor.

La presencia de metales pesados en concentraciones traza es fundamental para la actividad de los microorganismos que participan en las rutas metabólicas de degradación anaerobia. Algunos metales, como níquel, hierro, cobalto, zinc, tungsteno o molibdeno se encuentran en la composición de las enzimas que regulan estas rutas metabólicas (Zandvoort *et al.*, 2006). El efecto de la presencia de los metales pesados en la actividad de los microorganismos depende de su biodisponibilidad, por lo que es necesario, para evaluar su influencia en el proceso, llevar a cabo un estudio de su distribución en la biomasa (Osuna *et al.*, 2004). Con este fin se aplicó la técnica de extracción secuencial, que se basa en el principio de que los metales que se encuentran absorbidos o adsorbidos en la biomasa pueden ser desplazados utilizando el apropiado agente extractor (van Hullebusch *et al.*, 2005). Según el proceso de extracción se definen cuatro fracciones: intercambiable, carbonatos, materia orgánica y sulfuros y residual. Según Tessier *et al.* (1979), atendiendo a la solubilidad y a la reactividad de los metales de cada fracción, la biodisponibilidad de los metales se encuentra en orden decreciente en las fracciones indicadas, siendo más biodisponibles los metales de la fracción intercambiable y los menos los de la fracción residual.

El complejo enzimático monóxido de carbono deshidrogenasa, que contiene cobalto, se encuentra en la ruta metabólica de degradación de acetato y en las dos rutas posibles de degradación del fenol (Levén *et al.*, 2012). Además, este metal se encuentra en la coenzima M metil transferasa, que es un intermediario fundamental en la metanogénesis de cualquier sustrato (Zandvoort

et al., 2006). Así mismo, el cobalto se mostró eficaz para incrementar la actividad metanogénica en un reactor anaerobio que degradaba un agua residual del sector vitivinícola (Melamane *et al.*, 2007). En cualquier caso, ya que tanto cobalto como níquel forman parte del cofactor F430 y de los corrinoideos que intervienen en la metanogénesis (Sharma y Singh, 2001), Melamane *et al.* (2007) indicaron que la adición de 50 mg l⁻¹ de cobalto aumentaba la eficacia de eliminación de polifenol casi en un 30%, mientras que la adición de níquel no producía ningún efecto.

El tungsteno también juega un papel fundamental en la metanogénesis debido a que las enzimas que lo contienen se encuentran presentes en las reacciones catalíticas con bajo potencial químico que requieren condiciones anaerobias, por lo que la presencia de este metal estimula el crecimiento de varios tipos de procariotas, incluidas las del dominio *Archaea* (Kletzin y Adams, 1996).

7.1 PLAN DE TRABAJO

En la realización de este estudio se utilizó la biomasa granular proveniente de un reactor anaerobio de tipo RAFA que trataba agua residual industrial que contenía principalmente acetato y benzoatos (Shell, Moerdijk, Países Bajos). El estudio relativo a la dosis óptima de cobalto se realizó con dos compuestos diferentes: CoCl₂ y vitamina B₁₂, mientras que el de tungsteno se realizó con Na₂WO₄. La dosis a adicionar de cada elemento se determinó a partir del análisis de la actividad metanogénica específica y de la concentración de metal en la biomasa. En el caso de los compuestos de cobalto también se realizó el estudio cinético de bioadsorción.

7.1.1 Estudio cinético de bioadsorción de cobalto

Se efectuaron dos ensayos, uno a 25 °C y otro a 35 °C, utilizando una concentración de cobalto de 5 mg l⁻¹ tanto en forma de CoCl₂ como en forma de vitamina B₁₂ para poder evaluar el efecto del tipo de compuesto utilizado y de la temperatura sobre el proceso global de adsorción. Las condiciones experimentales de los ensayos cinéticos realizados se muestran en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1.- Condiciones experimentales de los ensayos de bioadsorción.

	Temperatura, °C	Concentración inicial, mg Co l ⁻¹	Masa adsorbente, g	Volumen disolución, ml
CoCl ₂	25	4.10	18.99	500
	35	4.10	19.30	500
Vitamina B ₁₂	25	3.61	14.73	500
	35	3.27	20.13	500

Una vez finalizados los ensayos se realizó la extracción secuencial del cobalto adsorbido en la biomasa, así como al inóculo utilizado.

7.1.2 Efecto de la dosificación de cobalto y de tungsteno sobre la actividad metanogénica

El efecto de la adición de cobalto y de tungsteno sobre la actividad metanogénica específica se evaluó en reactores en discontinuo con diferentes concentraciones de estos metales (Tabla 7.2 y Tabla 7.3). Los ensayos fueron realizados utilizando como sustrato una mezcla binaria de fenol y acetato sódico en una relación en DQO 1:4. Se añadieron a su vez, además de los macro y micronutrientes, las siguientes sales: NaCl l⁻¹, NaHCO₃ l⁻¹, K₂HPO₄ l⁻¹ y NaH₂PO₄ l⁻¹ (Tabla 3.7) para aportar una elevada salinidad y alcalinidad. Como micronutriente habitual en la operación de reactores anaerobios el cobalto fue añadido en los ensayos con tungsteno, sin embargo este último no fue adicionado en los realizados con cobalto.

Al finalizar los ensayos en los reactores en discontinuo se realizó la extracción secuencial de los metales de la biomasa.

Tabla 7.2.- Concentraciones de cobalto en la solución de nutrientes utilizadas en los ensayos de actividad metanogénica específica.

Número de reactor	Fuente de cobalto	Concentración cobalto, mg Co l ⁻¹
1, 2	No	0
3, 4	CoCl ₂	0.29
5, 6	CoCl ₂	5
7, 8	CoCl ₂	10
9, 10	CoCl ₂	20
11, 12	Vitamina B ₁₂	0.29
13, 14	Vitamina B ₁₂	5

Tabla 7.3.- Concentraciones de tungsteno en la solución de nutrientes (con 0.29 mg Co l⁻¹) utilizadas en los ensayos de actividad metanogénica específica.

Número de reactor	Concentración tungsteno, mg W l ⁻¹
15, 16	0
17, 18	0.5
19, 20	1
21, 22	3
23, 24	5

7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2.1 Caracterización del fango inicial

En la Tabla 7.4 se presentan los datos relativos a la caracterización del fango granular utilizado. Se destaca la presencia de tungsteno en el sobrenadante.

Tabla 7.4.- Caracterización del fango utilizado.

Parámetro	Valor
Concentración de sólidos totales, g l ⁻¹	96
Concentración de sólidos volátiles, g l ⁻¹	57
Concentración de sólidos suspendidos volátiles, g l ⁻¹	55
Concentración cobalto en sobrenadante, mg Co l ⁻¹	n.d
Concentración tungsteno en sobrenadante, mg W l ⁻¹	1.1

n.d.: no detectado

7.2.2 Estudio cinético de bioadsorción de cobalto

En la donde q es la masa adsorbida (mg g⁻¹), q_e es la adsorbida en el equilibrio (mg g⁻¹), K_2 es la constante de velocidad de pseudo-segundo orden (g mg⁻¹ h⁻¹) y t es el tiempo en el que la masa es adsorbida.

Para una misma temperatura, en presencia de CoCl₂ se observó un incremento entre el 44 y el 79% en la máxima capacidad de adsorción en equilibrio (q_e), respecto a la observada con vitamina B₁₂. La mayor capacidad de adsorción del cobalto en forma de sal binaria probablemente se encuentre asociada a una sobreestimación causada por la precipitación del cobalto previa a la difusión hacia la partícula. Para una misma especie de cobalto no se observó ninguna influencia de la temperatura sobre la capacidad máxima adsorción en el ensayo con CoCl₂, mientras que en el ensayo con vitamina B₁₂ se obtuvo sorprendentemente una mayor capacidad máxima de adsorción a 25 °C. Esta anomalía se encuentra asociada a la mayor relación cobalto biomasa que se utilizó en el ensayo a 25 °C, ya que la capacidad máxima de adsorción se encuentra relacionada con la concentración de metal presente en el medio para una concentración de biomasa y pH constantes, tal y como muestra la linearización de la ecuación de Freundlich propuesta por van Hullebusch *et al.* (2005):

$$\log q_e = \log k + \frac{1}{n} \log C_e \quad (7.2)$$

donde C_e es la concentración del metal en la solución y k y n son constantes relativas a la capacidad e intensidad de la adsorción respectivamente.

Por otro lado, la constante de velocidad de adsorción (K_2) con CoCl₂ fue un 43% superior en el reactor operado a 35 °C, mostrando así el efecto positivo de la temperatura sobre la adsorción de esta especie de cobalto. En el caso de la

vitamina B₁₂, la elevada diferencia en este parámetro entre ambas temperaturas puede encontrarse asociada a la menor concentración de biomasa en el ensayo a 25 °C, como se ha indicado anteriormente, y no por el efecto directo de la temperatura sobre el proceso de biosorción. Los datos obtenidos relativos a la velocidad inicial de adsorción (h) corroboraron la mayor velocidad de adsorción de cobalto a elevadas temperaturas. Otros autores muestran diferentes valores de máxima capacidad de adsorción y tasa inicial de adsorción con biomasa granular; por ejemplo van Hullebusch *et al.* (2004), utilizando una sal de cobalto, determinó una velocidad de adsorción de 0.0913 g mg⁻¹ h⁻¹ y Marzal *et al.* (2014), con una concentración de biomasa de 25 g l⁻¹ y de cobalto como CoCl₂ de 5 mg l⁻¹, obtuvieron una máxima capacidad de adsorción de 0.169 mg g⁻¹, mostrando que la adsorción de cobalto posee una elevada dependencia de la matriz.

Tabla 7.5 se muestran los parámetros cinéticos del ajuste lineal y en la Figura 7.1 la representación gráfica para el ajuste lineal de los datos experimentales para los dos compuestos de cobalto en estudio y las dos temperaturas experimentales. A partir del balance de materia se obtienen los valores de cobalto adsorbido en cada momento (q_t), de forma que para conocer la cantidad de metal adsorbida en el equilibrio y la constante de velocidad se representa gráficamente t/q_t respecto al tiempo y se realiza el ajuste lineal de los datos. En los procesos de adsorción de metales en biomasa granular se encuentran implicados tanto la transferencia de materia desde el medio ligado a la superficie del gránulo como la difusión dentro de la partícula, por lo que la cinética de adsorción se ajusta al modelo de pseudo-segundo orden (van Hullebusch *et al.*, 2004) desarrollado por Ho y McKay (1999), cuya expresión lineal es la siguiente:

$$\frac{t}{q} = \frac{t}{q_e} + \frac{1}{K_2 + q_e^2} \quad (7.1)$$

donde q es la masa adsorbida (mg g⁻¹), q_e es la adsorbida en el equilibrio (mg g⁻¹), K₂ es la constante de velocidad de pseudo-segundo orden (g mg⁻¹ h⁻¹) y t es el tiempo en el que la masa es adsorbida.

Para una misma temperatura, en presencia de CoCl₂ se observó un incremento entre el 44 y el 79% en la máxima capacidad de adsorción en equilibrio (q_e), respecto a la observada con vitamina B₁₂. La mayor capacidad de adsorción del cobalto en forma de sal binaria probablemente se encuentre asociada a una sobreestimación causada por la precipitación del cobalto previa a la difusión hacia la partícula. Para una misma especie de cobalto no se observó ninguna influencia de la temperatura sobre la capacidad máxima adsorción en el ensayo con CoCl₂,

mientras que en el ensayo con vitamina B₁₂ se obtuvo sorprendentemente una mayor capacidad máxima de adsorción a 25 °C. Esta anomalía se encuentra asociada a la mayor relación cobalto biomasa que se utilizó en el ensayo a 25 °C, ya que la capacidad máxima de adsorción se encuentra relacionada con la concentración de metal presente en el medio para una concentración de biomasa y pH constantes, tal y como muestra la linealización de la ecuación de Freundlich propuesta por van Hullebusch *et al.* (2005):

$$\log q_e = \log k + \frac{1}{n} \log C_e \quad (7.2)$$

donde C_e es la concentración del metal en la solución y k y n son constantes relativas a la capacidad e intensidad de la adsorción respectivamente.

Por otro lado, la constante de velocidad de adsorción (K₂) con CoCl₂ fue un 43% superior en el reactor operado a 35 °C, mostrando así el efecto positivo de la temperatura sobre la adsorción de esta especie de cobalto. En el caso de la vitamina B₁₂, la elevada diferencia en este parámetro entre ambas temperaturas puede encontrarse asociada a la menor concentración de biomasa en el ensayo a 25 °C, como se ha indicado anteriormente, y no por el efecto directo de la temperatura sobre el proceso de biosorción. Los datos obtenidos relativos a la velocidad inicial de adsorción (h) corroboraron la mayor velocidad de adsorción de cobalto a elevadas temperaturas. Otros autores muestran diferentes valores de máxima capacidad de adsorción y tasa inicial de adsorción con biomasa granular; por ejemplo van Hullebusch *et al.* (2004), utilizando una sal de cobalto, determinó una velocidad de adsorción de 0.0913 g mg⁻¹ h⁻¹ y Marzal *et al.* (2014), con una concentración de biomasa de 25 g l⁻¹ y de cobalto como CoCl₂ de 5 mg l⁻¹, obtuvieron una máxima capacidad de adsorción de 0.169 mg g⁻¹, mostrando que la adsorción de cobalto posee una elevada dependencia de la matriz.

Tabla 7.5.- Parámetros cinéticos del ajuste lineal del modelo de pseudo-segundo orden para el CoCl₂ y vitamina B₁₂.

Compuesto	Temperatura, °C	q _e , mg g ⁻¹	K ₂ , g mg ⁻¹ h ⁻¹	r ²	h, mg g ⁻¹ h ⁻¹
CoCl ₂	25	0.2145	4.2823	0.99	0.197
	35	0.2111	7.4701	0.99	0.333
Vitamina B ₁₂	25	0.1208	0.7058	0.96	0.010
	35	0.0436	9.8360	0.95	0.019

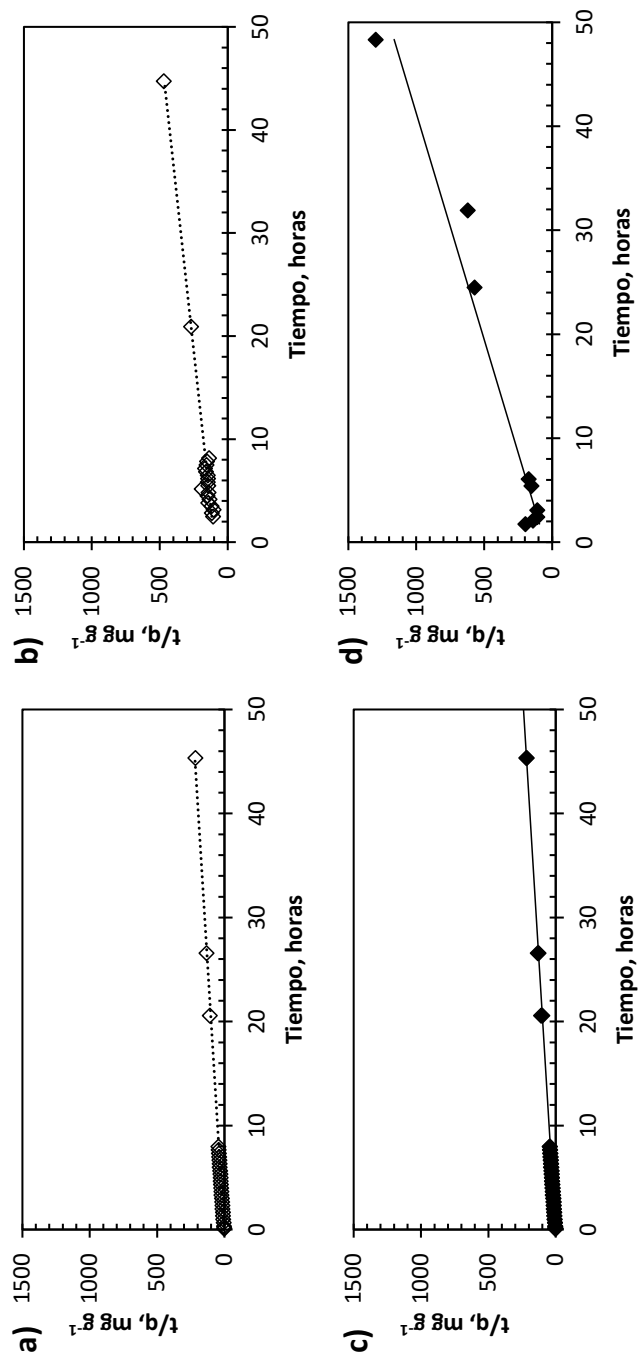


Figura 7.1.- Modelo de pseudo-segundo orden para: a) CoCl₂ a 25 °C, b) vitamina B₁₂ a 25 °C, c) CoCl₂ a 35 °C, d) vitamina B₁₂ a 35 °C

En la Figura 7.2 se presenta la distribución de cobalto en la biomasa al final del ensayo (mg kg^{-1} sólidos totales (ST)). Estos resultados muestran que, como cabría esperar, la concentración total del cobalto en la biomasa depende de la máxima capacidad de adsorción. La distribución del metal en la biomasa al final del ensayo fue diferente a la del inóculo y varió en función de la temperatura y la especie de cobalto. En el inóculo, la mayor parte del cobalto se encontraba en las fracciones intercambiable y de carbonatos, mientras que con vitamina B_{12} a 25°C y CoCl_2 la fracción predominante fue la de materia orgánica y sulfuros, mostrando la importancia de esta fracción en la adsorción de cobalto, también descrita por Osuna *et al.* (2004) y Zandvoort *et al.* (2006). En cambio, a 35°C y añadiendo vitamina B_{12} se produjo una acumulación similar en las fracciones intercambiable, carbonatos y materia orgánica y sulfuros. Comparando los experimentos a una misma temperatura, con vitamina B_{12} se obtuvo una mayor concentración en la fracción intercambiable, indicando que este micronutriente se encontraba más biodisponible con la adición de este compuesto. Este resultado pone de manifiesto la importancia de seleccionar la especie química en función del objetivo a conseguir.

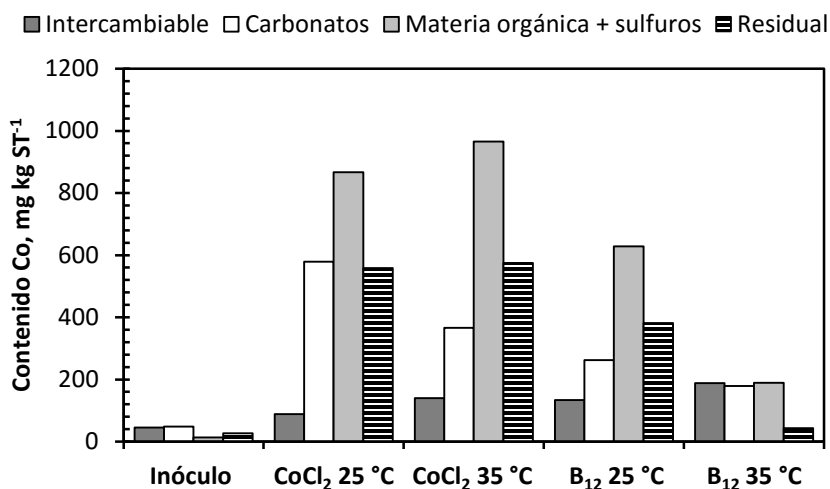


Figura 7.2.- Distribución final de la concentración de cobalto en la biomasa.

7.2.3 Efecto de la adición de cobalto y tungsteno en la actividad metanogénica

En la Figura 7.3 se muestran la AME obtenida para cada una de las concentraciones estudiadas de cobalto ($\text{ml CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$) y la distribución de

cobalto en la biomasa al final del experimento (mg kg^{-1} ST). Se alcanzaron valores similares en los ensayos realizados sin la adición de cobalto o con una concentración de cobalto de $0.29 \text{ mg Co l}^{-1}$, ya sea como CoCl_2 o vitamina B_{12} , o con la presencia de 5 mg Co l^{-1} en forma de sal, mostrando que el aporte de cobalto en el medio no favorece la actividad metabólica. A partir de 5 mg Co l^{-1} como vitamina B_{12} ó 10 mg Co l^{-1} como CoCl_2 se observa un descenso importante en la actividad metanogénica. Estos resultados indican que la mayor biodisponibilidad del cobalto como vitamina B_{12} produce la inhibición de la actividad metabólica con concentraciones bajas de cobalto en el medio. Otros autores han obtenido efecto inhibitorio con mayores concentraciones de este micronutriente. Así, Bhattacharya *et al.* (1995) observaron una inhibición de la metanogénesis entre un 7 y un 17% con la adición de cobalto como CoCl_2 en una concentración entre 600 y 800 mg l^{-1} , respectivamente; Gikas (2007) describió la completa inhibición de la metanogénesis con una concentración de cobalto entre 160 y 320 mg l^{-1} utilizando $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ como fuente de cobalto.

Los resultados obtenidos muestran que el inóculo utilizado en los ensayos poseía suficiente cantidad de cobalto (134.8 mg kg^{-1} ST) como para lograr una actividad metabólica adecuada, tal y como indica la presencia de cobalto en todas las fracciones. La elevada afinidad del cobalto como CoCl_2 a la fracción de los carbonatos (420 mg kg^{-1} ST) y la de la materia orgánica y sulfuros (740.5 mg kg^{-1} ST) causaron una mayor acumulación de éste en comparación con los realizados con vitamina B_{12} (carbonatos 274.6 mg kg^{-1} ST y materia orgánica y sulfuros 130.1 mg kg^{-1} ST). En el ensayo con vitamina B_{12} se obtuvo una concentración un 50% mayor de cobalto en la fracción intercambiable (187.7 mg kg^{-1} ST), corroborando la mayor afinidad de la vitamina B_{12} por esta fracción. Quizás este dato podría explicar el motivo por el que la adición de vitamina B_{12} causa efectos inhibitorios a menores concentraciones que el uso de CoCl_2 , ya que al estar más biodisponible su efecto tóxico resulta superior en caso de sobredosis.

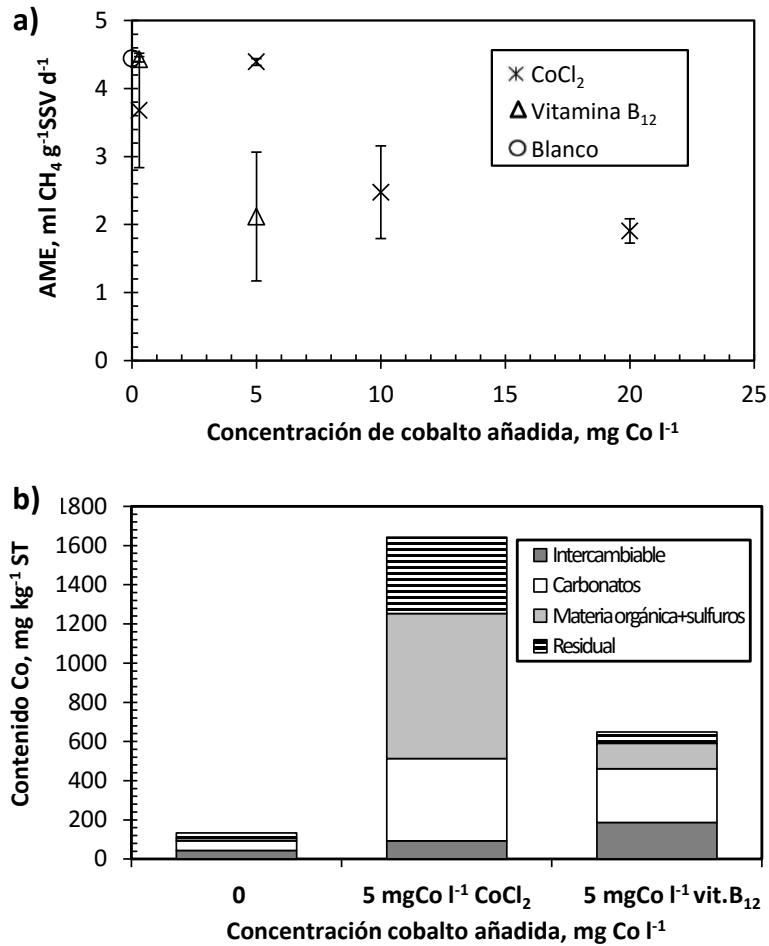


Figura 7.3.- Evolución en función de la concentración de cobalto añadida de: a) actividad metanogénica específica y b) distribución final de la concentración de cobalto en la biomasa.

El efecto de la concentración de tungsteno en el medio sobre la actividad metanogénica específica (ml CH₄ g⁻¹ SSV d⁻¹) y la distribución de este metal en la biomasa al final de los ensayos (mg kg⁻¹ ST) se presentan en la Figura 7.4. Una adición de 0.5 mg W l⁻¹ causó un aumento en los valores de AME del 17% en comparación al valor obtenido en el blanco, corroborando que el tungsteno estimula el crecimiento de las arqueas. Feng *et al.* (2010) determinaron un efecto estimulador sobre la producción de metano entre un 7 y un 15% con la suplementación de 1.8 mg W l⁻¹ durante la degradación anaerobia de residuos de la industria alimentaria. Sin embargo, en este estudio concentraciones de

tungsteno superiores a 1 mg W l^{-1} causaron la inhibición parcial de la metanogénesis, siendo ésta prácticamente la mitad de la máxima con una concentración de 5 mg W l^{-1} . La distribución del tungsteno en la biomasa al final de los ensayos muestra como para una concentración de 5 mg W l^{-1} aparece el tungsteno en la fracción intercambiable y, por lo tanto, esto explicaría la reducción en la producción específica de metano. Es decir, la dosis óptima es de 0.5 mg l^{-1} y con un margen estrecho, ya que a partir de 3 mg l^{-1} el efecto inhibitorio es notable.

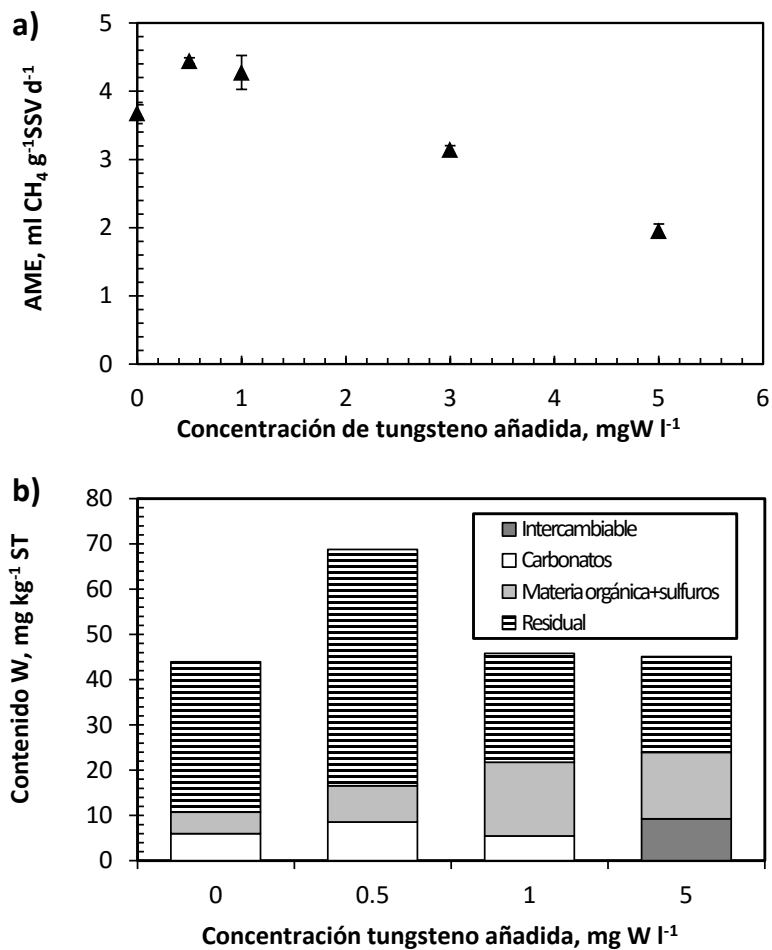


Figura 7.4.- Evolución en función de la concentración de tungsteno añadida de: a) actividad metanogénica específica y b) distribución final de la concentración de tungsteno en la biomasa.

7.3 CONCLUSIONES

El estudio del efecto de la adición de cobalto y tungsteno realizado con un fango anaerobio en la depuración de un agua residual sintética con acetato sódico y fenol con una relación 4:1 (unidades de DQO) y elevada salinidad se exponen a continuación.

Los ensayos cinéticos de bioadsorción de cobalto indican que su velocidad inicial de adsorción se encuentra favorecida a 35 °C frente a una operación realizada a 25 °C. Además, se ha determinado que la dosificación de cobalto como CoCl_2 presenta mayor afinidad a la fracción de la materia orgánica y los sulfuros; mientras que la dosificación como vitamina B_{12} presenta una ligera afinidad sobre la fracción intercambiable, por lo que el riesgo de sobredosificación puede ser mayor. El inóculo utilizado en este estudio, proveniente de una depuradora industrial, presentó la máxima actividad metanogénica específica, ya que contenía una concentración suficiente de cobalto para poder desarrollar la máxima actividad metanogénica, con 45.7 mg kg^{-1} ST en la fracción intercambiable de un total de 134.8 mg kg^{-1} ST. Con la adición de bajas dosis, 10 mg Co l^{-1} , se produjo la inhibición del proceso, aunque toleró concentraciones de cobalto como CoCl_2 de hasta 5 mg l^{-1} , pero no de vitamina B_{12} debido a su mayor biodisponibilidad.

Los análisis realizados en los reactores en discontinuo para diferentes concentraciones de tungsteno, junto con la determinación del contenido de tungsteno en la biomasa inóculo, mostraron que las pequeñas concentraciones de este metal en el fango, incluso en las fracciones no intercambiables, como 10 mg kg^{-1} ST entre las fracciones de carbonatos y materia orgánica y sulfuros, aseguraron una buena actividad metanogénica. La máxima actividad se obtuvo con el incremento del contenido de tungsteno en la biomasa hasta 70 mg kg^{-1} ST, causado por el aporte de 0.5 mg W l^{-1} , determinada como dosificación óptima del metal. Concentraciones superiores a 1 mg W l^{-1} provocaron la acumulación de tungsteno en la fracción intercambiable, lo que explicaría la inhibición de la actividad metanogénica.

Del estudio se puede concluir que la dosificación de micronutrientes como cobalto y tungsteno a fin de potenciar la actividad metanogénica debe ser adoptada ad-hoc para cada tipo de agua residual a depurar.

**8 PRUEBA DE CONCEPTO: APLICACIÓN BIOLAVADOR
ANAEROBIO DE LECHO GRANULAR PARA LA ELIMINACIÓN
DE COV EN EMISIONES DE AIRE DE LA INDUSTRIA
FLEXOGRÁFICA**

La industria flexográfica es uno de los sectores industriales que se encuentran afectados por la legislación ambiental relacionada con la emisión a la atmósfera de compuestos orgánicos volátiles debido al uso de tintas que contienen disolventes durante el proceso productivo. Con el objetivo de reducir las emisiones hasta los límites establecidos por la legislación se pueden realizar cambios en el proceso productivo o la sustitución de los disolventes utilizados. No obstante, en muchos casos es necesario desarrollar una tecnología económica y ambientalmente viable para el control de las emisiones.

A pesar de que en la actualidad los tratamientos biológicos aerobios se han mostrado capaces para la degradación de los compuestos presentes en las emisiones de la industria flexográfica (Sempere *et al.*, 2008), el espacio requerido para su instalación ha limitado su uso a nivel industrial. En este sentido, los sistemas anaerobios permiten el tratamiento de cargas orgánicas mayores, frente a una instalación industrial de un biofiltro percolador, incrementando así la viabilidad económica de los sistemas biológicos.

El biolavador anaerobio de lecho granular es una nueva configuración compuesta fundamentalmente por una torre lavadora y un reactor anaerobio de lecho granular para el tratamiento de COV de elevada solubilidad en agua, que se basa en la transferencia de los contaminantes del aire a una corriente de agua en la torre lavadora, emitiendo así un bajo contenido en COV a la atmósfera. El efluente líquido de la torre lavadora se introduce en un reactor anaerobio donde los disolventes son degradados, regenerando así la corriente de agua previamente a su introducción de nuevo en la torre lavadora.

En este capítulo se presenta la información sobre la prueba de concepto a escala de laboratorio de un biolavador anaerobio de lecho granular para la degradación de una corriente de aire contaminada con etanol. A pesar de que los estudios realizados sobre la degradación anaerobia de disolventes en reactores RALF muestran la viabilidad de la mineralización anaerobia de elevadas concentraciones de este compuesto, el acoplamiento de esta tecnología con una torre lavadora presenta una serie de retos pendientes de resolver. Entre estos retos se encuentra el acoplamiento hidráulico de ambos sistemas con diferentes necesidades de velocidades superficiales y tiempos de residencia, la eliminación del oxígeno previo a la introducción del agua residual al reactor anaerobio o la influencia de los cambios repentinos de carga orgánica en el sistema. En consecuencia, se ha diseñado, montado y evaluado el sistema como paso previo al diseño de un prototipo a escala de planta piloto.

8.1 PLAN DE TRABAJO

Esta prueba de concepto se realizó utilizando como único sustrato etanol y con una temperatura de operación de 25 °C. Con objeto de describir adecuadamente el plan de trabajo en la prueba de concepto es necesario definir los siguientes parámetros:

- Velocidad gas (v_g):

Es el cambio de posición de una molécula de gas por unidad de tiempo dentro de la torre lavadora y se expresa normalmente en $m h^{-1}$.

- Velocidad líquido (v_L):

Es el cambio de posición de una molécula de agua por unidad de tiempo dentro de la torre lavadora y se expresa normalmente en $m h^{-1}$.

En función de la carga orgánica aplicada y del patrón de alimentación de la misma se establecieron 3 fases diferentes, cuyas condiciones de operación vienen detalladas en la Tabla 8.1. Durante los periodos sin alimentación de COV (fase P-III) se mantuvo la recirculación del efluente del reactor anaerobio. A lo largo del experimento se mantuvieron constantes la velocidad del gas (v_g) y la velocidad del líquido (v_L) en la torre lavadora. Para acoplar el funcionamiento hidráulico del reactor anaerobio y de la torre lavadora, con caudales diferentes en función de las necesidades propias de cada sistema, se trabajó con un patrón de lavado intermitente de la torre lavadora con ciclos de 85 minutos de riego y 46 de no riego.

Tabla 8.1.- Condiciones de operación aplicadas a la torre lavadora y al reactor anaerobio durante la prueba de concepto de un biolavador anaerobio de lecho granular.

	P-I	P-II	P-III
	-----Torre lavadora-----		
Patrón de alimentación	24 h d ⁻¹ 7/7 d	24 h d ⁻¹ 7/7 d	16 h d ⁻¹ 7/7 d
v_g , m h ⁻¹	0.26	0.26	0.26
v_L , m h ⁻¹	3.2	3.2	3.2
Caudal másico etanol, g h ⁻¹	3	5.9	5.9
	-----Reactor RALF-----		
v_s , m h ⁻¹	14.3	14.3	14.3

v_g : velocidad gas; v_L : velocidad líquido; v_s : velocidad superficial

Para favorecer el agotamiento del oxígeno se instaló un tanque de mezcla como paso previo a la introducción en el reactor anaerobio del efluente de la torre lavadora. Se utilizó el potencial redox como parámetro de control.

A lo largo de la experimentación se realizaron medidas de la corriente gaseosa de entrada y salida de la torre lavadora con un analizador de hidrocarburos totales con el fin de determinar su eficacia, y se realizaron mediciones de materia orgánica disuelta y ácidos grasos volátiles en el tanque de mezcla y en el efluente del reactor anaerobio para determinar la eficacia del proceso anaerobio.

8.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 8.3 se muestran los resultados experimentales relacionados con la operación de la torre lavadora. La transferencia del etanol al agua mostró eficacias superiores al 74% durante toda la operación, que corresponde con cargas orgánicas superiores a 3.5 g DQO h⁻¹ a tratar en el reactor anaerobio.

Tabla 8.2.- Resultados experimentales correspondientes a la torre lavadora. Valores promedio y su desviación estándar.

	P-I	P-II	P-III
Días de operación	0-17	18-28	29-52
Patrón de alimentación	24 h d ⁻¹ 7/7 d	24 h d ⁻¹ 7/7 d	16 h d ⁻¹ 7/7 d
Alimentación etanol, g h ⁻¹	1.9	4.4±0.9	3.9±0.1
Emisión etanol, g h ⁻¹	0.3±0.3	1.0	0.6±0.1
EE, %	86.8±16.3	76.4	84.1±1.6
Carga orgánica transferida, g DQO h ⁻¹	3.5±0.7	6.9	6.7±0.1

EE: eficacia de eliminación.

En la Tabla 8.3 se presentan los resultados experimentales relacionados con la operación del reactor anaerobio de lecho granular. En la degradación anaerobia de este disolvente durante la fase P-I se obtuvieron las mayores eficacias de eliminación, con bajas concentraciones de ácidos grasos volátiles. De esta forma queda demostrado el buen funcionamiento de la prueba de concepto de esta nueva tecnología operando el reactor anaerobio con cargas orgánicas de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹, obteniendo eficacias de eliminación superiores al 94%. El aumento de la carga orgánica aplicada al reactor anaerobio a valores superiores a 35 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (fases P-II) produjo el deterioro progresivo del reactor, produciéndose la acumulación de ácidos grasos volátiles en concentraciones superiores a 1500 mg CH₃COOH l⁻¹, mostrando los primeros indicios de

sobresaturación del sistema, que no pudieron revertirse con la interrupción de la alimentación durante las noches (fase P-III). La elevada conductividad al final del ensayo indicó la acumulación de sodio, dosificado como bicarbonato sódico. Para reducir la presencia de este compuesto se ha de reducir la consigna de control del pH hasta valores neutros (en torno a 7), como los observados durante la operación con el reactor anaerobio en el Capítulo 4. Por lo que respecta a la concentración de oxígeno en disolución, la estrategia ideada para favorecer el consumo de éste entre la torre lavadora y el reactor anaerobio se mostró como suficiente, tal y como muestran los valores promedio de potencial redox del tanque de mezcla comprendidos entre -387.3 y -341.9 mV.

Tabla 8.3.- Resultados experimentales correspondientes al tanque de mezcla y al reactor anaerobio. Valores promedio y su desviación estándar.

	P-I	P-II	P-III
Días de operación	0-17	18-28	29-40
-----Tanque de mezcla-----			
pH	8.4±0.1	8.1±0.5	8.5±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	8.7±1.6	8.6±1.8	11.5±0.6
Potencial redox, mV	-387.3±22.8	-341.9±31.5	-362.1±28.7
-----Reactor anaerobio-----			
Temperatura, °C	24.6±0.2	24.8±0.1	24.9±0.6
v _s , m h ⁻¹	14.3	14.3	14.3
C _e , mg DQO l ⁻¹	604±99	3388	2394±1148
C _s , mg DQO l ⁻¹	209±44	3041±483	2042±850
CO*, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	21.2±4.0	36.9	27.1±0.5
CO*, kg DQO m ⁻³ h ⁻¹	0.9±0.2	1.5	1.7±0.1
AGV _e , mg CH ₃ COOH l ⁻¹	94.8±24.6	1630.1	1513.3±960.5
AGV _s , mg CH ₃ COOH l ⁻¹	110.5±32.2	2903.7±1897.2	1793.4±516.2
Producción metano, l h ⁻¹	0.9±0.3	1.6±0.4	1.4±0.1
Materia orgánica degradada*, g DQO d ⁻¹	74.1±4.8	112.7±25.0	54.9±12.1
EE**, %	94.8±17.0	76.7±17.0	50.8±10.6
pH	8.1±0.1	7.7±0.8	8.2±0.1
Conductividad, mS cm ⁻¹	8.8±1.3	9.3±1.1	11.8±1.0
Potencial redox, mV	-398.5±12.6	-321.9±130.5	-361.7±16.0
Alcalinidad, mg CaCO ₃ l ⁻¹	4475.7±698.8	2404.4±1153.4	5100.9±379.2

v_s: velocidad superficial; C_e: concentración influente; C_s: concentración efluente; CO: carga orgánica; AGV: ácidos grasos volátiles; EE: eficacia de eliminación.

*Referido al disolvente que se transfiere al agua

**Calculada a partir del disolvente transferido al agua y de la producción del metano

En la Figura 8.1 se presentan los resultados correspondientes a la variación temporal de la concentración de materia orgánica (mg DQO l^{-1}) en el efluente del reactor anaerobio (recirculación al lavador), la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente del reactor anaerobio ($\text{mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$), la producción de metano (l h^{-1}) y la evolución diaria de la concentración de ácidos grasos volátiles ($\text{mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$) en el influente y efluente del reactor anaerobio en la fase P-III.

La concentración de materia orgánica en el efluente durante la fase P-I se mantuvo en valores bajos, inferiores a $240 \text{ mg DQO l}^{-1}$. En la fase P-II, tras el aumento de la carga orgánica aplicada, se produjo la acumulación de ácidos grasos volátiles (hasta $5000 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$) y, por tanto, la sobrecarga del sistema. Las paradas nocturnas (fase P-III) mostraron que una interrupción diaria de 8 horas en el aporte de etanol no fue suficiente para reducir la concentración de materia orgánica acumulada en el biolavador al operar con elevadas cargas orgánicas, a pesar de mantenerse una producción de metano similar a la obtenida en las fases anteriores. Esto indica la inestabilidad del proceso operando con cargas de $1.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. En la operación a nivel industrial se sugiere el uso de la concentración de ácidos grasos volátiles como parámetro de control. De este modo, al trabajar con valores menores a $200 \text{ mg CH}_3\text{COOH l}^{-1}$, se evita la sobrecarga del reactor anaerobio. A escala de laboratorio se obtuvo una operación estable con cargas orgánicas aplicadas al reactor anaerobio menores a $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

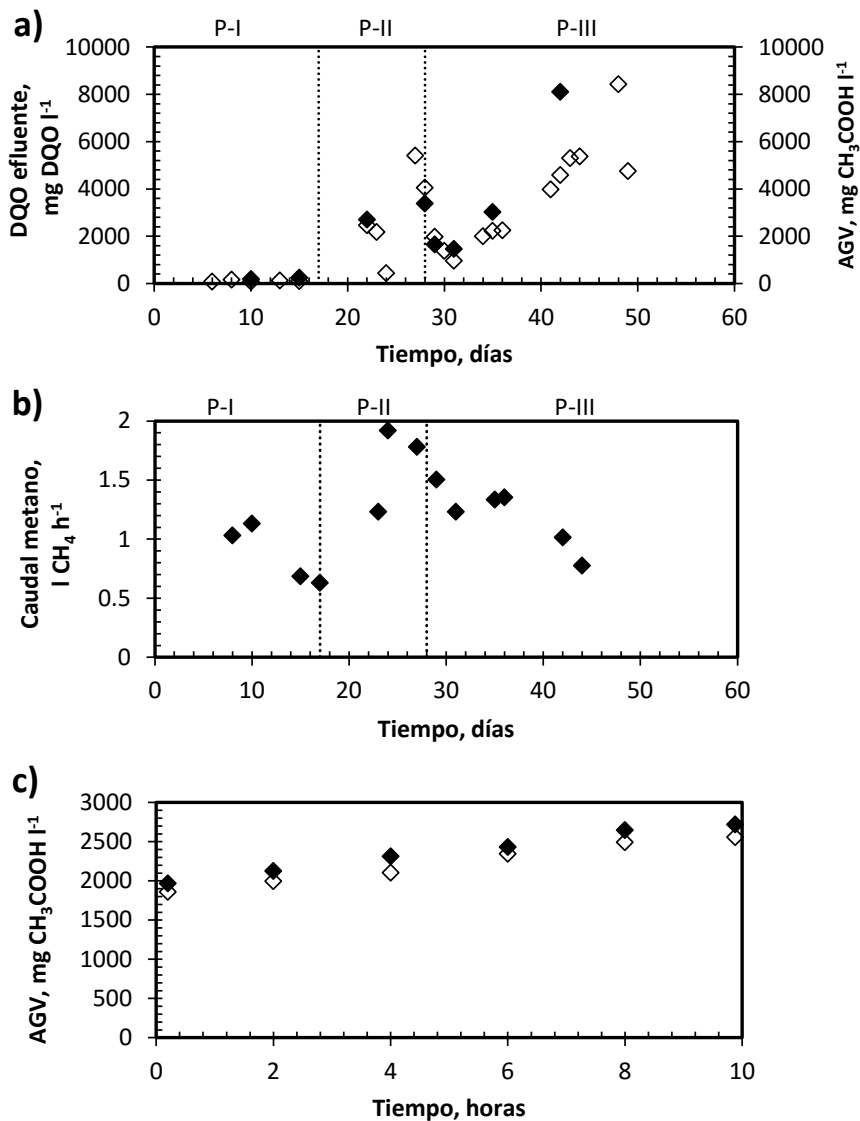


Figura 8.1.- Variación temporal de: a) concentración en el efluente del reactor RALF de \blacklozenge DQO y \diamond ácidos grasos volátiles, b) caudal de metano y c) respuesta dinámica del reactor RALF tras la reanudación de la alimentación (fase P-III): concentración de ácidos grasos volátiles en el \diamond influente y en el \blacklozenge efluente del reactor RALF.

En la Figura 8.2 se presenta la variación temporal de la pérdida de presión (mm H₂O) en la torre lavadora. El crecimiento y acumulación de biomasa en la torre lavadora se ve favorecido por la presencia de nutrientes y de una fuente de

carbono en la corriente de agua. Al comienzo del experimento se observó un aumento considerable de la pérdida de presión asociado a la obstrucción ocasionada por la acumulación de biomasa, pero con el establecimiento de un protocolo de limpieza periódica se controló la acumulación de ésta manteniendo la pérdida de presión en valores comprendidos entre 2.5 y 6.1 mm H₂O durante todo el ensayo.

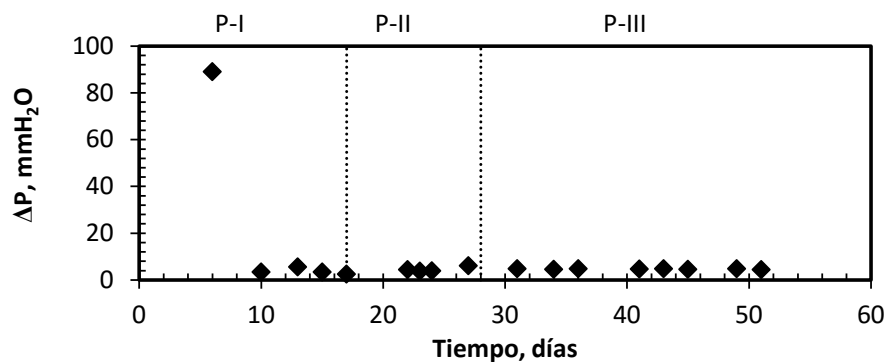


Figura 8.2.- Variación temporal de la pérdida de presión en la torre lavadora.

8.3 CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de la prueba de concepto de un biolavador anaerobio de lecho granular a escala de laboratorio se exponen a continuación.

La implementación de la prueba de concepto ha permitido establecer las bases para el desarrollo de esta tecnología y ultimar el diseño para aplicar este sistema a escala de planta piloto. Además, ha permitido establecer las condiciones necesarias para el acoplamiento de las operaciones y procesos implicados.

Los resultados obtenidos a escala de laboratorio demuestran la capacidad de esta nueva configuración para el tratamiento de emisiones de COV de elevada solubilidad en agua. La operación con un patrón de alimentación discontinuo con paradas nocturnas mostró que 8 horas sin alimentación no son suficientes para la degradación de la materia orgánica acumulada en el sistema trabajando con cargas orgánicas elevadas. A nivel industrial se sugiere la operación con concentraciones de ácidos grasos volátiles menores a 200 mg CH₃COOH l⁻¹, a fin de evitar la sobrecarga del reactor anaerobio. Estas concentraciones se han obtenido,

208 | Prueba de concepto: Aplicación biolavador anaerobio de lecho granular para la eliminación de COV en emisiones de aire de la industria flexográfica

a escala de laboratorio, con cargas orgánicas aplicadas al reactor anaerobio de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

9 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis doctoral se ha centrado en el estudio del proceso de degradación anaerobia de agua residual con presencia de disolventes orgánicos de uso habitual en el sector de la impresión flexográfica en un reactor anaerobio de lecho granular de tipo RALF, estableciendo las bases para el desarrollo de la tecnología del biolavador anaerobio para el control de emisiones de COV en aire. Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son:

- I. El reactor anaerobio de lecho granular se ha mostrado como una tecnología eficaz para el tratamiento de disolventes orgánicos provenientes de las tintas utilizadas en el sector de la impresión flexográfica bajo la operación en condiciones mesofílicas subóptimas y psicofílicas.
- II. Este es el primer estudio que demuestra la degradación anaerobia de 1-metoxi-2-propanol, disolvente de uso industrial, en un reactor de tipo RALF, demostrando que esta tecnología es adecuada para el tratamiento de este disolvente bajo condiciones mesofílicas subóptimas (25 °C) y psicofílicas (18 °C). La introducción de 1-metoxi-2-propanol en el influente con presencia de etanol necesitó de un tiempo de adaptación para su degradación, relacionado con la ausencia de enzimas encargadas de la ruptura del enlace éter, que fue mayor a 18 °C, indicando la menor velocidad en el desarrollo de las enzimas necesarias para el proceso de degradación a bajas temperaturas. Las máximas cargas orgánicas degradadas de 1-metoxi-2-propanol, con eficacias de eliminación superiores al 90%, fueron de 6.1 y 9 kg DQO m⁻³ d⁻¹ para los reactores operados a 18 y 25 °C, respectivamente. Interrupciones largas en la operación de los reactores (1 mes) conllevaron similares periodos de adaptación para la degradación de 1-metoxi-2-propanol, demostrando la pérdida de la actividad enzimática cuando la biomasa no está expuesta a este disolvente.
- III. En el tratamiento de 1-metoxi-2-propanol se aplicaron interrupciones en el aporte de sustrato de 8 horas al día y/o 56 horas a la semana, habituales el proceso productivo del sector flexográfico, resultando en la reducción de las cargas orgánicas eliminadas de este disolvente hasta 7.2 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en la operación a 25 °C. Tras las interrupciones de 8 horas (nocturnas) se observó la rápida recuperación de la actividad metanogénica, sin embargo después de 56 horas sin aporte de sustrato se redujo

la producción de metano, mostrando la influencia adversa sobre el proceso de periodos cíclicos sin aporte de sustrato de más de 2 días.

- IV. La técnica de biología molecular de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante y el posterior aislamiento y secuenciación de las bandas obtenidas ha permitido el análisis de la composición de las comunidades de *Bacteria* y *Archaea* desarrolladas en los reactores operados a 18 y 25 °C y su variación a lo largo de la operación para la degradación de 1-metoxi-2-propanol. Parte de las especies identificadas pueden estar relacionadas, según bibliografía, con la degradación de los disolventes presentes en el influente. Este es el caso del género *Acetobacterium*, implicado en la degradación de éteres glicólicos y de la especie de arquea *Methanosaeta concilii*, relacionada con la degradación sintrófica de etanol.
- V. El tratamiento de varias mezclas multicomponente compuestas por etanol y acetato de etilo como mayoritarios y acetona, 1-metoxi-2-propanol e isopropanol como minoritarios a 25 °C demostró la capacidad de este sistema para degradar anaerobiamente elevadas cargas orgánicas (45 kg DQO m⁻³ d⁻¹). Los resultados obtenidos mostraron que en la aplicación industrial de esta tecnología se pueden tratar diferentes mezclas de disolventes habituales en el uso de tintas de la industria flexográfica, siempre y cuando se apliquen cargas orgánicas bajas de disolventes como isopropanol y 1-metoxi-2-propanol.
- VI. En esta tesis se ha mostrado que la aplicación de cargas orgánicas elevadas, de hasta 35 kg DQO m⁻³ d⁻¹, bajo condiciones de aporte intermitente de sustrato puede conllevar a la desgranulación parcial de la biomasa. De las estrategias utilizadas para la potenciar la granulación, la reducción combinada de la velocidad superficial y de la carga orgánica se ha mostrado adecuada. Los resultados obtenidos muestran que la adición de floculantes no resulta en un efecto particularmente positivo para la granulación de la biomasa parcialmente desgranulada. Esto se debe, probablemente, a que con la desgranulación no desaparecen completamente los centros de nucleación en la biomasa.

- VII. El estudio de la dosificación de metales pesados como micronutrientes ha permitido el desarrollo y validación de la metodología empleada y ha mostrado que la dosis óptima de cada micronutriente depende de la cantidad de éstos presente inicialmente en la biomasa granular, por lo que debe ser adoptada ad hoc para el agua residual industrial y el micronutriente seleccionado. El fango utilizado en este estudio provenía de una depuradora industrial y contenía una cantidad de cobalto y tungsteno suficiente para asegurar una buena actividad metanogénica, por lo que la adición incluso de bajas dosis produjo la inhibición del proceso. Se recomienda el uso de CoCl_2 como fuente de cobalto, ya que la mayor biodisponibilidad mostrada por la dosificación en forma de vitamina B_{12} produce la inhibición de la actividad microbiana con menores concentraciones de cobalto en el medio. En cuanto al tungsteno, la adición de concentraciones superiores a 1 mg l^{-1} produjo su acumulación en la fracción intercambiable. La presencia de tungsteno en esta fracción produce la inhibición del proceso de degradación de disolventes.
- VIII. El desarrollo de la prueba de concepto de un biolavador anaerobio de lecho granular se realizó con éxito, estableciendo las bases para el cambio de escala a tamaño piloto e industrial, así como el establecimiento de las condiciones necesarias para el acoplamiento de las operaciones y procesos implicados en el sistema.

Esta tesis doctoral constituye el primer estudio sobre la degradación anaerobia en reactores de lecho granular de disolventes orgánicos de uso habitual en el sector de la impresión flexográfica. Los resultados obtenidos suponen una valiosa información para sentar las bases para la transferencia y comercialización de esta tecnología para el control de las emisiones de COV en aire en el sector industrial en general, y en el de impresión flexográfica en particular. A fin de profundizar en el conocimiento sobre esta nueva tecnología, se continúa trabajando en las siguientes líneas.

- I. Estudio de los mecanismos implicados en la degradación del 1-metoxi-2-propanol, a partir de la identificación de los compuestos intermediarios y/o las enzimas que intervienen en su degradación anaerobia.

- II. Estudio sobre la potenciación de la granulación de la biomasa con la adición de floculantes, como el quitosán, en un cultivo en suspensión, inóculo de fácil disponibilidad, que permita disminuir los costes de puesta en marcha a escala industrial.
- III. A fin de aplicar este proceso novedoso al campo de los disolventes orgánicos, cuando la emisión únicamente contiene la fuente de carbono, resulta necesario evaluar la dosificación óptima de micro y macronutrientes que permite obtener una adecuada actividad metabólica, y así optimizar los costes de operación. Para la realización de este estudio se propone el uso de las técnicas de determinación de la actividad metanogénica específica y la extracción secuencial de metales de la biomasa desarrollados en esta tesis doctoral.
- IV. En esta tesis doctoral se ha puesto de manifiesto que al aplicar elevadas cargas orgánicas se puede producir la desgranulación parcial de la biomasa, por lo que se va a estudiar nuevas configuraciones de reactor anaerobio para favorecer la retención de los microorganismos.
- V. Se ha diseñado y se está operando un prototipo industrial para establecer los parámetros de diseño y protocolos de operación que den lugar a la adopción de la tecnología para el control de emisiones de COV en aire del sector flexográfico.

10 CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

This doctoral thesis has been focused on the anaerobic degradation of wastewater containing organic solvents usually found in the flexographic sector in an EGSB reactor. This work lays the foundation for the development of anaerobic bioscrubber as a technology to control VOC emissions in air. The following conclusions can be inferred from results obtained:

- I. Expanded granular sludge bed anaerobic reactor has been proven as an effective treatment option to degrade organic solvents coming from the use of inks in the flexographic sector under suboptimal mesophilic and psychrophilic temperatures.
- II. This is the first study on anaerobic degradation of 1-methoxy-2-propanol, a solvent of broad industrial use, by an EGSB reactor. The obtained results demonstrate that this is a feasible technology to remove this solvent at sub-optimal mesophilic (25 °C) and psychrophilic (18 °C) temperatures. The addition of 1-methoxy-2-propanol to an influent wastewater with ethanol as pollutant resulted in an adaptation period for biodegradation related to the absence of enzymes responsible of the cleavage of glycol ether bond. This adaptation period was higher at 18 °C, which indicates the minor velocity in the production of enzymes involved in the degradation process at lower temperatures. Maximum organic loading rates of 1-methoxy-2-propanol, with removal efficiencies higher than 90%, were 6 and 9 kg COD m⁻³ d⁻¹ for reactors operated at 18 and 25 °C, respectively. The need of a re-acclimatization period to degrade 1-methoxy-2-propanol after long substrate interruption period (1 month) demonstrated the loss of enzymatic activity when biomass is not exposed to this solvent.
- III. Substrate supply interruptions during 8 hours a day and/or 56 hours a week, usually applied at industrial processes, caused a decline in the maximum 1-methoxy-2-propanol organic removal rate to 7.2 kg COD m⁻³ d⁻¹ at 25 °C. A fast recovery of methanogenic activity was observed after 8 hours (nights) without wastewater supply, while after 56 hours without substrate supply methane yield decreased. This indicates the adverse influence on the anaerobic process of cyclic periods of more than 2 days without substrate supply.

- IV. Molecular biology tools such as denaturing gradient gel electrophoresis and subsequent band isolation and sequencing enabled the analysis of *Bacteria* and *Archaea* community structure and its variation along operation. These molecular biology tools have allowed analyzing the microbiological community composition developed in reactors operated at 18 and 25 °C for 1-methoxy-2-propanol degradation. According to literature, some of identified species could be related with the degradation of the influent solvents. For instance, *Acetobacterium* is involved in the cleavage of glycol ether bond and *Methanosaeta concilii*, from *Archaea* domain, is involved in syntrophic degradation of ethanol.
- V. The feasibility of this system for mineralizing several mixtures of solvents containing ethanol and ethyl acetate as main components and acetone, 1-methoxy-2-propanol and isopropanol as minor ones at 25 °C has been demonstrated at organic loading rates as high as 45 kg COD m⁻³ d⁻¹. The obtained results in this study indicate, as long as low organic loading rates of solvents such as isopropanol and 1-methoxy-2-propanol are applied, the feasibility of treating solvent mixtures usually emitted during the use of inks in flexographic facilities.
- VI. The combination of high organic loading rates, up to 35 kg COD m⁻³ d⁻¹, and intermittent substrate supply resulted in partial degranulation of biomass. Reduction of up flow velocity and organic loading rate was a suitable strategy for granulation. The obtained results indicated that addition of flocculants did not result in a particularly positive effect on granulation of partially degranulated biomass. This is, probably, due to nucleation centers in biomass did not completely disappear with degranulation.
- VII. The study of heavy metal dosage as micronutrients enabled to develop and validate the methodology proposed. The obtained results showed that optimum nutrient dosage depends on the quantity of each metal in the inoculum, so ad hoc studies should be made for each industrial wastewater to be treated and for each micronutrient. In this particular study, inoculum came from an industrial wastewater treatment plant, and it contained enough cobalt and tungsten quantity to assure good methanogenic activity. So the addition of these metals, even at low

concentrations, caused the inhibition of the process. Among cobalt species tested for cobalt supplementation, CoCl_2 is recommended. This was due to higher bioavailability of cobalt as vitamin B_{12} led to the inhibition of microbial activity with lower cobalt added comparing to CoCl_2 supplementation. Regarding tungsten dosing, accumulation of this metal was observed in the exchangeable fraction with the addition of concentrations higher than 1 mg l^{-1} . The content of tungsten in this fraction produces the inhibition of solvent degradation process.

- VIII. Successful implementation of the proof of concept of anaerobic scrubber was accomplished. This lay the foundation for the development of this technology and to scaling up to pilot and industrial scale. Basis for coupling operations and processes involved in the operation of this system were also established.

This doctoral thesis is the first study on anaerobic degradation of organic solvents habitually used in the flexographic sector by granular sludge bed reactors. The obtained results represent valuable information to lay the groundwork for the transfer and commercialization of this technology to control VOC emission in air from industrial sector in general, and particularly from flexography sector. In order to achieve a deeply knowledge of this new technology, research continues on the following lines of work.

- I. Study of mechanisms involved in 1-methoxy-2-propanol mineralization by identification of by-products and/or enzymes implicated in its anaerobic degradation.
- II. Study on enhancing biomass granulation with the addition of flocculants, such as chitosan, using suspended sludge as inoculum. This strategy could enable lower costs associated to reactor start-up at industrial scale due to the high availability of suspended sludge.
- III. In order to apply this novel process to organic solvent sector, on which emission only contains organic carbon source, the evaluation of macro and micro nutrient optimal dosage to optimize operating costs is required. For this purpose, the usage of techniques developed in this doctoral thesis for specific methanogenic activity determination and biomass metal sequential extraction procedure is proposed.

- IV. This doctoral thesis has revealed that partial degranulation of biomass could be produced during the application of high organic loading rates, so new anaerobic reactor configurations to enhance microorganism retention should be investigated.
- V. In order to adopt this technology for VOC emission control in flexographic facilities design parameters and operation protocols should be established. For this purpose, an industrial prototype has been designed and is currently in use.

11 NOMENCLATURA

AAI	Autorización ambiental integrada
AEMA	Agencia europea del medio ambiente
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGV	Concentración de ácidos grasos volátiles, mg CH ₃ COOH l ⁻¹
AMBR	<i>Anaerobic migrating bed reactor</i>
AME	Actividad metanogénica específica, ml CH ₄ g SSV ⁻¹ d ⁻¹
AOS	Aerosoles orgánicos secundarios
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATP	Adenosin trifosfato
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
C	Citosina
C_e	Concentración influente
CE	Capacidad de eliminación, g m ⁻³ h ⁻¹
CI	Carbono inorgánico
Co	Coenzima
CO	Carga orgánica, kg DQO m ⁻³ d ⁻¹
COD	Carbono orgánico disuelto
COT	Carbono orgánico total
COV	Compuesto orgánico volátil
COVNM	Compuesto orgánico volátil no metano
C_s	Concentración efluente
CT	Carbono total
DCM	Diclorometano
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DQO	Demanda química de oxígeno

EC	<i>European Commission</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EE	Eficacia de eliminación, %
EGSB	<i>Expanded granular sludge bed reactor</i>
EU	<i>European Union</i>
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido
G	Guanina
h	Tasa inicial de bioadsorción, $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
H	Constante de la ley de Henri
IC	<i>Internal circulation reactor</i>
ICP-OES	<i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IR	Infrarrojo
IVF	Índice volumétrico de fango, $\text{ml g}^{-1} \text{SS}$
K₂	Constante de velocidad de pseudo-segundo orden, $\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$
k_{al}	Constante de disociación
k_s	Constante de saturación
LED	<i>Light emitting diode</i>
M2P	1-metoxi-2-propanol
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MTD	Mejores técnicas disponibles
N	Newton (unidad de fuerza del Sistema Internacional de Unidades)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBM	Potencial bioquímico del metano, $\text{ml CH}_4 \text{g}^{-1} \text{DQO}$
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
P_g	Fración molar de gas en el aire, $\text{mol gas mol}^{-1} \text{aire}$
PGE	Polietilenglicol

ppm	Partes por millón
PRTR	<i>Pollutant release and transfer register</i>
P_T	Presión total, atm
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i>
q_e	Masa adsorbida en el equilibrio, mg g ⁻¹
q_t	Masa adsorbida en un tiempo t, mg g ⁻¹
RAFA	Reactor anaerobio de flujo ascendente
RALF	Reactor anaerobio de lecho fluidizado o expandido
RALF 1	Reactor anaerobio de lecho expandido 1
RALF 2	Reactor anaerobio de lecho expandido 2
RALF 3	Reactor anaerobio de lecho expandido 3
RAMM	Reactor anaerobio de manto migracional
RCTA	Reactor continuo de tanque agitado
RD	Real Decreto
SS	Sólidos suspendidos, mg SS l ⁻¹
SSV	Sólidos suspendidos volátiles, mg SS l ⁻¹
ST	Sólidos totales, mg SS l ⁻¹
SV	Sólidos volátiles, mg SS l ⁻¹
t	Tiempo
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TC	Tetracloruro de carbono
TEC	Tricloroetileno
TRVV	Tiempo de residencia a volumen vacío, s
UASB	<i>Up flow anaerobic sludge blanket</i>
UNT	Unidad nefelométrica de turbidez
v_g	Velocidad gas, m h ⁻¹
v_L	Velocidad líquido, m h ⁻¹

VLA-EC	Valores límite ambiental de exposición de corta duración, mg m^{-3}
VLA-ED	Valores límite ambiental de exposición diaria, mg m^{-3}
VLE	Valor límite de emisión
v_s	Velocidad superficial, m h^{-1}

LETRAS GRIEGAS

ΔG	Energía libre de Gibbs
ΔG^0	Energía libre de formación
ΔG_{adh}	Energía libre de adhesión
ΔP	Pérdida de presión, $\text{mm H}_2\text{O}$
χ_g	Fracción molar del gas en el agua, mol gas mol^{-1} agua

12 BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, T., Sanjeevi, R., Anuradha, J. y Abbasi, S. A. (2013). Impact of Al³⁺ on sludge granulation in UASB reactor. *Indian Journal of Biotechnology*, 12, 254–259.
- Acta Única Europea, de 17 de febrero de 1986.
- Agencia Europea del Medio Ambiente. (2014). *Air quality in Europe. EEA report 5/2014*. Copenague, Dinamarca.
- Ahn, Y. (2000). Physicochemical and microbial aspects of anaerobic granular biopellets. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 35(9), 1617–1635.
- Ahring, B. K., Ibrahim, A. a. y Mladenovska, Z. (2001). Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Research*, 35(10), 2446–2452.
- Ahring, B. K., Sandberg, M. y Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(3), 559–565.
- Aiyuk, S., Forrez, I., Lieven, D. K., van Haandel, A. y Verstraete, W. (2006). Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates—a review. *Bioresource Technology*, 97(17), 2225–2241.
- Aiyuk, S. y Verstraete, W. (2004). Sedimentological evolution in an UASB treating SYNTHES, a new representative synthetic sewage, at low loading rates. *Bioresource Technology*, 93(3), 269–278.
- Alves, M., Cavaleiro, A. J., Ferreira, E. C., Amaral, A. L., da Motta, M., Motta, M., Vivier, H. y Pons, M.-N. (1998). Characterisation by image analysis of anaerobic sludge under shock conditions. *Water Science & Technology*, 41(12), 207–214.
- Amani, T., Nosrati, M. y Sreerishnan, T. R. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environmental Reviews*, 18(NA), 255–278.
- Andreesen, J. R., Bahl, H. y Gottsehalck, G. (1989). Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. En: N. P. Minton y D. Clarke (Eds.), *Biotechnology handbooks. Vol. 3 Clostridia* (pp. 27–62). New York: Plenum Press.
- Angenent, L. T., Banik, G. C. y Sung, S. (2001). Anaerobic migrating blanket reactor treatment of low-strength wastewater at low temperatures. *Water Environment Research*, 73(5), 567–574.

- Angenent, L. T. y Sung, S. (2001). Development of anaerobic migrating blanket reactor (AMBR), a novel anaerobic treatment system. *Water Research*, 35(7), 1739–1747.
- Arcand, Y., Guiot, S. R., Desrochersa, M. y Chavarieb, C. (1994). Impact of the reactor hydrodynamics and organic loading on the size and activity of anaerobic granules. *Chemical Engineering Journal*, 56, 23–35.
- Aydin, A. F., Ersahin, M. E., Dereli, R. K., Sarikaya, H. Z. y Ozturk, I. (2010). Long-term anaerobic treatability studies on opium alkaloids industry effluents. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 45(2), 192–200.
- Balch, W. E., Schoberth, S., Tanner, R. S. y Wolfe, R. S. (1977). *Acetobacterium*, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaerobic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27(4), 355–361.
- Ben Hania, W., Postec, A., Aüllo, T., Ranchou-Peyruse, A., Erauso, G., Brochier-Armanet, C., Hamdi, M., Ollivier, B., Saint-Laurent, S., Magot, M. y Fardeau, M. L. (2013). *Mesotoga infera* sp. nov., a mesophilic member of the order Thermotogales, isolated from an underground gas storage aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART8), 3003–3008.
- Berenjian, A., Chan, N. y Malmiri, H. J. (2012). Volatile organic compounds removal methods: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(4), 220–229.
- Bhattacharya, S. K., Uberoi, V., Madura, R. L. y Haghghi-Podeh, M. R. (1995). Effect of cobalt on methanogenesis. *Environmental Technology*, 16(3), 271–278.
- Bhunia, P. y Ghangrekar, M. M. (2008). Effects of cationic polymer on performance of UASB reactors treating low strength wastewater. *Bioresource Technology*, 99(2), 350–358.
- Bitton, G. (2011). *Wastewater microbiology* (4th ed.). Wiley-Blackwell.
- Boonsawang, P., Laeh, S. y Intrasungkha, N. (2008). Enhancement of sludge granulation in anaerobic treatment of concentrated latex wastewater. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 30, 111–119.
- Bratskaya, S., Schwarz, S. y Chervonetsky, D. (2004). Comparative study of humic acids flocculation with chitosan hydrochloride and chitosan glutamate. *Water Research*, 38(12), 2955–2961.

- Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J. y Wolfe, R. S. (1967). Methanobacillus omelianskii, a Symbiotic Association of Two Species of Bacteria. *Archiv Für Mikrobiologie*, 59, 20–31.
- Cánovas-Díaz, M. y Howell, J. (1988). Downflow fixed-film anaerobic reactors stability studies under organic and hydraulic overloading at different working volume. *Water Research*, 22(5), 529–536.
- Chen, J. y Lun, S. (1993). Study on mechanism of anaerobic sludge granulation in UASB reactors. *Water Science & Technology*, 28(7), 171–178.
- Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q. y Gu, G. (2007). Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*, 41(3), 683–689.
- Chua, H., Hu, W. F., Yu, P. H. F. y Cheung, M. W. L. (1997). Responses of an anaerobic fixed-film reactor to hydraulic shock loadings. *Bioresource Technology*, 61(1), 79–83.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. y Eaton, A. D. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC, USA.: American Public Health Association.
- Cohen, A., Breure, A. M., van Andel, J. G. y Van Deursen, A. (1982). Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose-II: stability and kinetic response to shock loadings. *Water Research*, 16, 449–455.
- Colleran, E., Finnegan, S. y Lens, P. (1995). Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 29–46.
- Collins, G., Woods, A., McHugh, S., Carton, M. W. y O'Flaherty, V. (2003). Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(2), 159–170.
- Connaughton, S., Collins, G. y O'Flaherty, V. (2006). Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18 degrees C. *Water Research*, 40(5), 1009–1017.
- Dar, S. A., Kleerebezem, R., Stams, A. J. M., Kuenen, J. G. y Muyzer, G. (2008). Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 1045–1055.

- Datta, A. y Philip, L. (2012). Biodegradation of volatile organic compounds from paint industries. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(3), 564–580.
- Del Pozo, R., Diez, V. y Salazar, G. (2002). Start-up of a pilot-scale anaerobic fixed film reactor at low temperature treating slaughterhouse wastewater. *Water Science & Technology*, 46, 215–221.
- Delhoménie, M.-C. y Heitz, M. (2005). Biofiltration of air: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 53–72.
- Deshusses, M. a. (1997). Biological waste air treatment in biofilters. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3), 335–339.
- Deviny, J. S., Deshusses, M. A. y Webster, T. S. (2000). *Biofiltration for air pollution control*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.
- Dhaked, R. K., Singh, P. y Singh, L. (2010). Biomethanation under psychrophilic conditions. *Waste Management*, 30(12), 2490–2496.
- Dimroth, P. y Hilpert, W. (1984). Carboxylation of pyruvate and acetyl coenzyme A by reversal of the Na⁺ pumps oxaloacetate decarboxylase and methylmalonyl-CoA decarboxylase. *Biochemistry*, 23(22), 5360–5366.
- Directiva 2001/81/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2001 sobre techos nacionales de emisión de determinados contaminantes atmosféricos.
- Directiva 2010/75/UE, de 24 de noviembre de 2010 sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación). DO L334/17, 17 de diciembre de 2010.
- Directiva 96/61/CE, de 24 de septiembre relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación.
- Dragt, A. (1992). Opening address. En: A. J. Dragt y J. van Ham (Eds.), *Biotechniques for Air Pollution Abatement and Odour Control Policies*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Driessen, W. y Yspeert, P. (1999). Anaerobic treatment of low, medium and high strength effluent in the agro-industry. *Water Science and Technology*, 40(8), 221–228.

- Eichler, B. y Schink, B. (1985). Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Archives of Microbiology*, 143(1), 60–66.
- Elías, X., Flotats, X. y Campos, E. (2012). Procesos biológicos. La digestión anaerobia y el compostaje: tratamiento y valoración energética de residuos. En: X. Elías (Ed.), *Tratamiento y valorización energética de residuos*. Díaz de Santos.
- Elmamouni, R., Leduc, R. y Guiot, S. (1998). Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Science and Technology*, 38(8-9), 341–347.
- Eng, S. C., Fernandes, X. A. y Paskins, A. R. (1986). Biochemical effects of administering shock loads of sucrose to a laboratory-scale anaerobic (UASB) effluent treatment plant. *Water Research*, 20(6), 789–794.
- Enright, A. M., Collins, G. y O'Flaherty, V. (2007). Low-temperature anaerobic biological treatment of toluene-containing wastewater. *Water Research*, 41(7), 1465–1472.
- Enright, A. M., McHugh, S., Collins, G. y O'Flaherty, V. (2005). Low-temperature anaerobic biological treatment of solvent-containing pharmaceutical wastewater. *Water Research*, 39(19), 4587–4596.
- European Commission. (2006). *European Union Risk Assessment Report. 1-methoxypropan-2-ol (PGME)*. Italy.
- European Commission. (2009). *Guidance on VOC substitution and reduction for activities covered by VOC solvents emissions directive*. European Commission.
- European Commission. (2014). *Best Available Techniques (BAT) Reference Document for Common Waste water and Waste Gas the Chemical Sector*. European Commission.
- Fang, H. H. P., Liang, D. W., Zhang, T. y Liu, Y. (2006). Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. *Water Research*, 40(3), 427–434.
- Feng, X. M., Karlsson, A., Svensson, B. H. y Bertilsson, S. (2010). Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste-linking process to microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(1), 226–240.
- Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C. y Tiedje, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3697–3704.

- Fincher, E. L. y Payne, W. J. (1962). Bacterial utilization of ether glycols. *Applied Microbiology*, 6, 542–547.
- Flotats, X., Rodríguez-Abalde, Á., Fernández, B. y Palatsi, J. (2011). Identificación de parámetros para la simulación del proceso de digestión anaerobia y producción de biogás. *Automática E Instrumentación*, 428, 69–74.
- Fongastitkul, P., Mavinic, D. S. y Lo, K. V. (1994). A two-phased anaerobic digestion process: concept, process failure and maximum system loading rate. *Water Environment Research*, 66(3), 243–254.
- Generalitat de Catalunya. (2005). *Prevenió de la contaminació en l'ús de dissolvents. Manuals d'ecogestió núm. 22*. Barcelona, España.
- Ghangrekar, M. M., Asolekar, S. R. y 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.
- Gikas, P. (2007). Kinetic responses of activated sludge to individual and joint nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)): An isobolographic approach. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1-2), 246–256.
- Godon, J., Zumstein, E., Dabert, P. y Habouzit, R. I. C. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2802–2813.
- Gonzalez-gil, G., Lens, P. N. L., van Aelst, A., van As, H., Versprille, A. I. y Lettinga, G. (2001). Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3683–3692.
- Gooden, W. J. (1998). *Biodegradation of propylene glycol-based Mil-a-8243D aircraft deicer*.
- Gounot, A. M. (1986). Psychrophilic and psychrotrophie microorganisms. *Experientia*, 42, 1192–1197.
- Grady, C. P. L., Daigger, G. T. y Lim, H. C. (2011). *Biological wastewater treatment* (Third edit.). New York: Taylor & Francis.

- Graentzdoerffer, A., Rauh, D., Pich, A. y Andreesen, J. R. (2003). Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. *Archives of Microbiology*, 179(2), 116–130.
- Grotenhuis, J. T., Smit, M., Plugge, C. M., Xu, Y. S., van Lammeren, A. A., Stams, A. J. y Zehnder, A. J. (1991). Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7), 1942–1949.
- Guiot, S. R., Paus, a. y Costerton, J. W. (1992). A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water Science and Technology*, 25(7), 1–10.
- Han, S. K., Kim, S. H. y Shin, H. S. (2005). UASB treatment of wastewater with VFA and alcohol generated during hydrogen fermentation of food waste. *Process Biochemistry*, 40(8), 2897–2905.
- Heertjes, P. M. y van der Meer, R. R. (1978). Dynamics of liquid flow in an up-flow reactor used for anaerobic treatment of wastewater. *Biotechnology and Bioengineering*, 20(10), 1577–1594.
- Helps, C. R., Harbour, D. A. y Corry, J. E. L. (1999). PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1-2), 57–65.
- Henry, M. P., Donlon, B. A., Lens, P. N. y Colleran, E. M. (1996). Use of anaerobic hybrid reactors for treatment of synthetic pharmaceutical wastewaters containing organic solvents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 66(3), 251–264.
- Ho, Y. S. y McKay, G. (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, 34(5), 451–465.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. y Igarashi, Y. (2006). Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1623–1630.
- Huang, J., Xiao, L. y Xi, C. (2014). Performance and microbial community analysis of a pilot-scale UASB for corn-ethanol wastewater treatment. *Biotechnology Letters*.

- Hudayah, N., Suraraksa, B. y Chaiprasert, P. (2012). The effect of synthetic cationic polymer addition on nucleation of anaerobic granules under different organic loading rate. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(4), 264–269.
- Hulshoff Pol, L. W., de Castro Lopes, S. I., Lettinga, G. y Lens, P. N. L. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, 38(6), 1376–1389.
- Hulshoff Pol, L. W., de Zeeuw, W. J., Velzeboer, C. T. M. y Lettinga, G. (1983). Granulation in UASB reactors. *Water Science & Technology*, 15, 291–304.
- Hulshoff Pol, L. W., Lens, P. N. L., Stams, A. J. M. y Lettinga, G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*, 9, 213–224.
- Huser, B. A., Wuhrmann, K. y Zehnder, A. J. B. (1982). *Methanothrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiology*, 132, 1–9.
- Iino, T., Mori, K. y Suzuki, K. I. (2010). *Methanospirillum lacunae* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a puddly soil, and emended descriptions of the genus *Methanospirillum* and *Methanospirillum hungatei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(11), 2563–2566.
- Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo. (2015). Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2015. *Disponible en línea: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/LEP%20_VALORES%20LIMITE/Valores%20limite/Limites2015/Limites%20de%20exposicion%202015.pdf*. Fecha de acceso: enero 2015.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. *Disponible en línea: <http://www.insht.es>*. Fecha de acceso: enero 2015.
- Janssen, A. J. H., Lettinga, G. y Keizer, A. De. (1999). Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur. Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 151, 389–397.
- Janssen, P. H. y Schink, B. (1995). Metabolic pathways and energetics of the acetone-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfobacterium cetonicum*. *Archives of Microbiology*, 163(3), 188–194.

- Jetten, M. S. M., Stams, A. J. M. y Zehnder, A. J. B. (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotrix soehngeni* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiology Reviews*, 88, 181–198.
- Jing, Z., Hu, Y., Niu, Q., Liu, Y., Li, Y. Y. y Wang, X. C. (2013). UASB performance and electron competition between methane-producing archaea and sulfate-reducing bacteria in treating sulfate-rich wastewater containing ethanol and acetate. *Bioresource Technology*, 137, 349–357.
- Johnson, J., Parker, W. y Kennedy, K. (2000). Enhanced scrubbing of chlorinated compounds from air streams. *Environmental Progress*, 19(3), 157–166.
- Jones, W. J., Nagle, D. P. y Whitman, W. B. (1987). Methanogens and the diversity of Archaeobacteria. *Microbiological Reviews*, 51(1), 135–177.
- Jung, K. W., Kim, D. H. y Shin, H. S. (2011). A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(2), 1466–1473.
- Kallistova, A. Y., Goel, G. y Nozhevnikova, A. N. (2014). Microbial diversity of methanogenic communities in the systems for anaerobic treatment of organic waste. *Microbiology*, 83(5), 462–483.
- Kalyuzhnyi, S., Fragoso, C. L. y Martinez, J. R. (1997). Biological sulfate reduction in a UASB reactor fed with ethanol as the electron donor. *Microbiology*, 68(Proceedings of the EERO workshop), 562–567.
- Kalyuzhnyi, S. V., Sklyar, V. I., Davlyatshina, M. A., Parshina, S. N., Simankova, M. V., Kostrikina, N. A. y Nozhevnikova, A. N. (1996). Organic removal and microbiological features of UASB-reactor under various organic loading rates. *Bioresource Technology*, 55(95), 47–54.
- Karlsson, A., Ejlertsson, J., Nezirevic, D. y Svensson, B. H. (1999). Degradation of phenol under meso- and thermophilic, anaerobic conditions. *Anaerobe*, 5(1), 25–35.
- Kashyap, D. R., Dadhich, K. S. y Sharma, S. K. (2003). Biomethanation under psychrophilic conditions: a review. *Bioresource Technology*, 87(2), 147–153.
- Kato, M. T., Field, J. A., Versteeg, P. y Lettinga, G. (1994). Feasibility of expanded granular sludge bed reactors for the anaerobic treatment of low-strength soluble wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(4), 469–479.

- Kawai, F. (2002). Microbial degradation of polyethers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(1), 30–38.
- Kennedy, K. J. y Lentz, E. M. (2000). Treatment of landfill leachate using sequencing batch and continuous flow upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Research*, 34(14), 3640–3656.
- Kettunen, R. H. y Rintala, J. A. (1997). The effect of low temperature (5-29 °C) and adaptation on the methanogenic activity of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(4), 570–576.
- Khan, F. I. y Ghoshal, A. K. (2000). Removal of volatile organic compounds from polluted air. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 13(6), 527–545.
- Khemkhao, M., Nuntakumjorn, B., Techkarnjanaruk, S. y Phalakornkule, C. (2011). Effect of chitosan on UASB treating POME during a transition from mesophilic to thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 102(7), 4674–4681.
- Kletzin, A. y Adams, M. W. W. (1996). Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(1), 5–63.
- Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, R. a, Gartemann, K. H., Krömeke, H., Neuweger, H., Pühler, A., Runte, K. J., Schlüter, A., Stoye, J., Szczepanowski, R., Tauch, A. y Goemann, A. (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology*, 136(1-2), 91–101.
- Kroschwitz, J., Seidel, A., Kirk, R. E. y Othmer, D. F. (2007). *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. (J. Kroschwitz y A. Seidel, Eds.) (5th ed.). Hoboken (NJ): Wiley-Interscience.
- Kumar, T. P., Kumar, M. A. y Chandrajit, B. (2011). Biofiltration of volatile organic compounds (VOCs) – An overview. *Research Journal of Chemical Sciences*, 1(8), 83–92.
- Laguna, A., Ouattara, A., Gonzalez, R. O., Baron, O., Fama, G., El Mamouni, R., Guiott, S., Monroy, O. y Macarie, H. (1999). A simple and low cost technique. *Water Science and Technology*, 40(8), 1–8.
- Laloui-Carpentier, W., Li, T., Vigneron, V., Mazéas, L. y Bouchez, T. (2006). Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(3-4), 423–434.

- Leclerc, M., Delgènes, J. P. y Godon, J. J. (2004). Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology*, 6(8), 809–819.
- Leitão, R. C., van Haandel, A. C., Zeeman, G. y Lettinga, G. (2006). The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: a review. *Bioresource Technology*, 97(9), 1105–18.
- Lertsittichai, S., Lertsutthiwong, P. y Phalakornkule, C. (2007). Improvement of upflow anaerobic sludge bed performance using chitosan. *Water Environment Research*, 79(7), 801–807.
- Lettinga, G. (1995a). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3–28.
- Lettinga, G. (1995b). Anaerobic reactor technology. En: *International course on anaerobic wastewater treatment*. Wageningen Agriculture University, Delft, The Netherlands.
- Lettinga, G., Rebac, S. y Zeeman, G. (2001). Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, 19(9), 363–370.
- Lettinga, G., van Velsen, A. F. M., Hobma, S. W., de Zeeuw, W. y Klapwijk, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 699–734.
- Levén, L., Nyberg, K., Korkea-Aho, L. y Schnürer, A. (2006). Phenols in anaerobic digestion processes and inhibition of ammonia oxidising bacteria (AOB) in soil. *The Science of the Total Environment*, 364(1-3), 229–238.
- Levén, L., Nyberg, K. y Schnürer, A. (2012). Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste--a review of important microorganisms and impact of temperature. *Journal of Environmental Management*, 95 Suppl, S99–S103.
- Levén, L. y Schnürer, A. (2005). Effects of temperature on biological degradation of phenols, benzoates and phthalates under methanogenic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55(2), 153–160.
- Ley 16/2002, de 1 de julio de prevención y control integrados de la contaminación.

- Ley 5/2013, de 11 de junio, por la que se modifican la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación y la Ley 22/2011, de 26 de julio, de residuos y suelos contaminados.
- Li, J., Yu, L., Yu, D., Wang, D., Zhang, P. y Ji, Z. (2014). Performance and granulation in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating saline sulfate wastewater. *Biodegradation*, 25(1), 127–136.
- Lim, S. J. y Kim, T. H. (2014). Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment processes. *Biomass and Bioenergy*, 60, 189–202.
- Lin, Y., He, Y., Meng, Z. y Yang, S. (2008). Anaerobic treatment of wastewater containing methanol in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 2(2), 241–246.
- Liu, Y. y Tay, J. H. (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22(7), 533–563.
- Liu, Y., Xu, H. Lou, Yang, S. F. y Tay, J. H. (2003). Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research*, 37(3), 661–673.
- Ma, K., Liu, X. y Dong, X. (2006). *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 127–131.
- MacLeod, F. A., Guiot, S. R. y Costerton, J. W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in anaerobic sludge bed and filter reactor upflow. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1598–1607.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (2004). *Brock. Biology of microorganisms* (10th ed.). Pearson Prentice Hall.
- Mahmoud, N., Zeeman, G., Gijzen, H. y Lettinga, G. (2004). Anaerobic stabilisation and conversion of biopolymers in primary sludge-effect of temperature and sludge retention time. *Water Research*, 38(4), 983–991.
- Mahoney, E. M., Varangu, L. K., Cairns, W. L., Kosaric, N. y Murray, R. G. E. (1987). The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up. *Water Science & Technology*, 19(1985), 249–260.

- Marzal, P., Álvarez, C., Lafita, C. y Izquierdo, M. (2014). Performance of heavy metals in anaerobic reactors : study of biosorption onto anaerobic granular biomass. En: *21st International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2014 and 17th Conference PRES 2014*. Prague, Czech Republic.
- Mchugh, S., O'Reilly, C., Mahony, T., Colleran, E. y Flaherty, V. O. (2003). Anaerobic granular sludge bioreactor technology. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2, 225–245.
- McInerney, M. J., Struchtemeyer, C. G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A. J. M., Schink, B., Rohlin, L. y Gunsalus, R. P. (2008). Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 58–72.
- McKeown, R. M., Scully, C., Mahony, T., Collins, G. y O'Flaherty, V. (2009). Long-term (1243 days), low-temperature (4-15 °C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: bioprocess performance and physiological characteristics. *Water Research*, 43(6), 1611–1620.
- Melamane, X. L., Tandlich, R. y Burgess, J. E. (2007). Treatment of wine distillery wastewater by high rate anaerobic digestion. *Water Science & Technology*, 56(2), 9–16.
- Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. (2013). *Inventario de emisiones de España, años 1990-2011. Comunicación a la secretaría del convenio de Ginebra y al programa EMEP*.
- Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. (2014). *Inventarios nacionales de emisiones a la atmósfera 1990-2012. Volumen 2: análisis por actividades emisoras de la nomenclatura SNAP-97*.
- Miron, Y., van Lier, J. B. y 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.
- Moosbrugger, R. E., Wentzel, M. C., Ekama, G. A. y Marais, G. R. (1992). *Simple titration procedures to determine H₂CO₃ alkalinity and short chain fatty acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acid/bases*. WRC Report W74.
- Morgan, J. W., Evison, L. M. y Forsterf, C. F. (1991). The internal architecture of anaerobic sludge granules. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 50, 221–226.

- Myers, R., Maniatis, T. y Lerman, L. S. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 155, 501–527.
- Nadais, H., Capela, I. y Arroja, L. (2006). Intermittent vs continuous operation of upflow anaerobic sludge bed reactors for dairy wastewater and related microbial changes. *Water Science & Technology*, 54(2), 103–109.
- Nadais, H., Capela, I., Arroja, L. y Duarte, A. (2005). Optimum cycle time for intermittent UASB reactors treating dairy wastewater. *Water Research*, 39(8), 1511–1518.
- Nagase, M. y Matsuo, T. (1982). Interactions between amino-acid-degrading bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 2227–2239.
- Nakano, M. M. y Zuber, P. (2004). *Stric and facultative anaerobes: medical and environmental aspects*. Northfork, United kingdom: CRC Press LLC.
- Nevin, K. P., Holmes, D. E., Woodard, T. L., Hinlein, E. S., Ostendorf, D. W. y Lovley, D. R. (2005). *Geobacter bemidjiensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe(III)-reducing subsurface isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1667–1674.
- Noyola, A. y Moreno, G. (1994). Granule production from raw waste activated sludge. *Water Science & Technology*, 30(12), 339–346.
- Nuntakumjorn, B., Khumsalud, W., Vetsavas, N., Sujjaviriyasup, T. y Phalakornkule, C. (2008). Comparison of sludge granule and UASB performance by adding chitosan in different forms. *Chiang Mai Journal of Sciences*, 35(1), 95–102.
- O’Flaherty, V., Lens, P. N. L., de Beer, D. y Colleran, E. (1997). Effect of feed composition and upflow velocity on aggregate characteristics in anaerobic upflow reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 102–107.
- O’Reilly, J., Lee, C., Collins, G., Chinalia, F., Mahony, T. y O’Flaherty, V. (2009). Quantitative and qualitative analysis of methanogenic communities in mesophilically and psychrophilically cultivated anaerobic granular biofilms. *Water Research*, 43(14), 3365–3374.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2014). Calidad del aire (exterior) y salud. Nota descriptiva nº 313. Disponible en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/es/>. Fecha de acceso: enero 2015.

- Osuna, M. B., van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H., Iza, J. y Lens, P. N. L. (2004). Effect of cobalt sorption on metal fractionation in anaerobic granular sludge. *Journal of Environmental Quality*, 33(4), 1256–1270.
- Oude Elferink, S. J. W. H., Visser, A., Hulshoff Pol, L. W. y Stams, A. J. M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 119–136.
- Patel, G. B. (1984). Characterization and nutritional properties of *Methanotherx concilii* sp. nov., a mesophilic, acetoclastic methanogen. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(11), 1383–1396.
- Pavlostathis, S. G. y Giraldo-Gomez, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science & Technology*, 24(8), 35–59.
- Pelletier, E., Kreimeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R., Rivière, D., Ganesan, A., Daegelen, P., Sghir, A., Cohen, G. N., Médigue, C., Weissenbach, J. y Le Paslier, D. (2008). “Candidatus *Cloacamonas acidaminovorans*”: Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2572–2579.
- Pérez, M. C., Álvarez-Hornos, F. J., San-Valero, P., Marzal, P. y Gabaldón, C. (2013). Microbial community analysis in biotrickling filters treating isopropanol air emissions. *Environmental Technology*, 34(19), 2789–2798.
- Phalakornkule, C. y Khemkhao, M. (2010). Enhancing biogas production and UASB start-up by chitosan addition. En: S. Kumar (Ed.), *Biogas*. In Tech.
- Platen, H., Janssen, P. H. y Schink, B. (1994). Fermentative degradation of acetone by an enrichment culture in membrane-separated culture devices and in cell suspensions. *FEMS Microbiology Letters*, 122, 27–32.
- Platen, H. y Schink, B. (1987). Methanogenic degradation of acetone by an enrichment culture. *Archives of Microbiology*, 149, 136–141.
- Postgate, J. R. (1969). Methane as a minor product of pyruvate metabolism by sulphate and other bacteria. *Journal of General Microbiology*, 57, 293–302.
- Rajeshwari, K. V, Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K. y Kishore, V. V. N. (2000). State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4, 135–156.

- Ramsay, I. R. y Pullammanappallil, P. C. (2001). Protein degradation during anaerobic wastewater treatment : derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, 12, 247–257.
- RD 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- RD 815/2013, de 18 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento de emisiones industriales y de desarrollo de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación.
- Rebac, S., Ruskova, J., Gerbens, S., van Lier, J. B., Stams, A. J. M. y Lettinga, G. (1995). High-rate anaerobic treatment of wastewater under psychrophilic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(5), 499–506.
- Reglamento (CE) nº 166/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de enero de 2006 relativo al establecimiento de un registro europeo de emisiones y transferencias de contaminantes y por el que se modifican las Directivas 91/689/CEE y 96/61/CE del Consejo.
- Resolución de 14 de enero de 2008 de la Secretaría General para la Prevención de la Contaminación y el Cambio Climático, por la que se publica el Acuerdo de 7 de diciembre de 2007, del Consejo de Ministros, por el que se aprueba el II Programa Nacional de Reducción de Emisiones, conforme .
- Revah, S. y Morgan-Sagastume, J. M. (2005). Methods of odor and VOC control. En: Z. Shareefdeen y A. Singh (Eds.), *Biotechnology for odor and air pollution control*. heidelberg, Germany: Springer.
- Roussy, J., Van Vooren, M. y Guibal, E. (2005). Chitosan for the coagulation and flocculation of mineral colloids. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 25(5), 663–677.
- Sakar, S., Yetilmezsoy, K. y Kocak, E. (2009). Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment-a literature review. *Waste Management & Research : The Journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA*, 27(1), 3–18.
- Saleh, M. M. A. y Mahmood, U. F. (2004). Anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. En: *Eighth International Water Technology Conference* (pp. 817–833). Alexandria, Egipto.

- Sam-soon, P., Loewenthal, R. E., Dold, P. L. y Marais, G. R. (1987). Hypothesis for pelletisation in the upflow anaerobic sludge bed reactor. *Water SA*, 13(2), 69–80.
- San-Valero, P., Peña-Roja, J. M., Sempere, F. y Gabaldon, C. (2013). Biotrickling filtration of isopropanol under intermittent loading conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(7), 975–984.
- Satoh, H., Miura, Y., Tsushima, I. y Okabe, S. (2007). Layered structure of bacterial and archaeal communities and their in situ activities in anaerobic granules. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7300–7307.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 262–280.
- Schmidt, J. E. y Ahring, B. K. (1993). Effects of magnesium on thermophilic acetate-degrading granules in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(4), 304–310.
- Schmidt, J. E. y Ahring, B. K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(3), 229–246.
- Schonheit, P., Kristjansson, J. K. y Thauer, R. K. (1982). Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. *Archives of Microbiology*, 132, 285–288.
- Schramm, E. y Schink, B. (1991). Ether-cleaving enzyme and diol dehydratase involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by a new *Acetobacterium* sp. *Biodegradation*, 2(2), 71–79.
- Schwartz, L. J. (1991). Toxic effects of selected industrial solvents in batch and continuous anaerobic reactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28, 297–305.
- Scully, C., Collins, G. y O'Flaherty, V. (2006). Anaerobic biological treatment of phenol at 9.5-15 degrees C in an expanded granular sludge bed (EGSB)-based bioreactor. *Water Research*, 40(20), 3737–3744.
- Seghezzi, L., Zeeman, G., van Lier, J. B., Hamelers, H. V. M. y Lettinga, G. (1998). A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, 65, 175–190.

- Seitz, H. J., Schink, B., Pfennig, N. y Conrad, R. (1990). Energetics of syntrophic ethanol oxidation in defined chemostat cocultures 1. Energy requirement for H₂ production and H₂ oxidation. *Archives of Microbiology*, 155, 82–88.
- Sempere, F. (2010). *Depuració d'emissions de composts orgànics volàtils a l'atmosfera mitjançant biofiltres percoladors. Estudi a escala de laboratori i la seua aplicació industrial*. Universitat de València.
- Sempere, F., Gabaldón, C., Martínez-Soria, V., Marzal, P., Peña-roja, J. M. y Álvarez-Hornos, F. J. (2008). Performance evaluation of a biotrickling filter treating a mixture of oxygenated VOCs during intermittent loading. *Chemosphere*, 73(9), 1533–1539.
- Sempere, F., Martínez-Soria, V., Peña-roja, J. M., Waalkens, A. y Gabaldón, C. (2012). Control of VOC emissions from a flexographic printing facility using an industrial biotrickling filter. *Water Science & Technology*, 65(1), 177–182.
- Shareefdeen, Z., Herner, B. y Singh, A. (2005). Biotechnology for air pollution control—an overview. En: Z. Shareefdeen y A. Singh (Eds.), *Biotechnology for odor and air pollution control*. Heidelberg, Germany: Springer.
- Sharma, J. y Singh, R. (2001). Effect of nutrients supplementation on anaerobic sludge development and activity for treating distillery effluent. *Bioresource Technology*, 79, 203–206.
- Shcherbakova, V. A., Chuviiskaya, N. A., Rivkina, E. M., Pecheritsyna, S. A., Laurinavichius, K. S., Suzina, N. E., Osipov, G. A., Lysenko, A. M., Gilichinsky, D. A. y Akimenko, V. K. (2005). Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov. *Extremophiles*, 9(3), 239–246.
- She, Z., Zhu, Y., Li, L., Xie, T., Wang, L. y Huang, J. (2012). Granulation of sludge in anaerobic baffled reactor with inert carrier under room temperature. En: *2012 Third International Conference on Digital Manufacturing & Automation* (pp. 450–453).
- Shelobolina, E. S., Vrionis, H. A., Findlay, R. H. y Lovley, D. R. (2008). *Geobacter uraniireducens* sp. nov., isolated from subsurface sediment undergoing uranium bioremediation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), 1075–1078.

- Show, K. Y., Wang, Y., Foong, S. F. y Tay, J. H. (2004). Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Research*, 38(9), 2293–2304.
- Siggins, A., Enright, A.-M. y O’Flaherty, V. (2011). Temperature dependent (37-15°C) anaerobic digestion of a trichloroethylene-contaminated wastewater. *Bioresource Technology*, 102(17), 7645–7656.
- Singh, A., Shareefdeen, Z. y Ward, O. P. (2005). Bioscrubber technology. En: Z. Shareefdeen y A. Singh (Eds.), *Biotechnology for odor and air pollution control*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Speece, R. E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, 17(9), 416–427.
- Speranza, G., Mueller, B., Orlandi, M., Morelli, C. F., Manitto, P. y Schink, B. (2002). Mechanism of anaerobic ether cleavage: conversion of 2-phenoxyethanol to phenol and acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 11684–11690.
- Sueoka, K., Satoh, H., Onuki, M. y Mino, T. (2009). Microorganisms involved in anaerobic phenol degradation in the treatment of synthetic coke-oven wastewater detected by RNA stable-isotope probing. *FEMS Microbiology Letters*, 291(2), 169–174.
- Sun, D., Wang, A., Cheng, S., Yates, M. D. y Logan, B. (2014). *Geobacter* anodireducens sp. nov., a novel exoelectrogenic microbe in Bioelectrochemical systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 3485–3491.
- Supaphol, S., Jenkins, S. N., Intomo, P., Waite, I. S. y O’Donnell, A. G. (2011). Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresource Technology*, 102, 4021–4027.
- Symons, G. E. y Buswell, A. M. (1933). The methane fermentation of carbohydrates. *Journal of American Chemistry Association*, 55, 2028–2036.
- Syutsubo, K., Harada, H., Ohashi, A. y Suzuki, H. (1997). An effective start-up of thermophilic UASB reactor by seeding mesophilically-grown granular sludge. *Water Science and Technology*, 36(6-7), 391–398.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.

- Tarasov, A. L., Borzenkov, I. A. y Beliaev, S. S. (2011). The study of the trophic relations between anaerobic microorganisms from an underground gas storage during methanol utilization. *Mikrobiologiya*, 80(2), 192–199.
- Tay, J. H., Xu, H. lou y Teo, K. chuan. (2000). Molecular mechanism of granulation I: H⁺ translocation-dehydration theory. *Journal of Environmental Engineering*, 126, 403–410.
- Taylor, D. G., Trudgill, P. W., Cripps, R. E. y Harris, P. R. (1980). The microbial metabolism of acetone. *Journal of General Microbiology*, 118, 159–170.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L. y Stensel, H. D. (2003). Wastewater engineering: treatment and reuse. McGraw-Hill.
- Teo, K. C., Xu, H. Lou y Tay, J. H. (2000). Molecular mechanism of granulation II: proton translocating activity. *Journal of Environmental Engineering*, 126, 411–418.
- Terzis, E. (1994). Anaerobic treatment of industrial wastewater containing organic solvents. *Water Science and Technology*, 29(9), 321–329.
- Tessier, A., Campbell, P. G. C. y Bisson, M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51(7), 844–851.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. y Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviewers*, 41(1), 100–180.
- Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B., Vandermeren, P. y Verstraete, W. (1995). Granulation and sludge bed stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to surface thermodynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3681–3686.
- The Massachusetts Toxics Use Reduction Institute. (1994). *Alternatives to petroleum and solvent based inks*. Massachussets.
- Tiwari, M. K., Guha, S., Harendranath, C. S. y Tripathi, S. (2005). Enhanced granulation by natural ionic polymer additives in UASB reactor treating low-strength wastewater. *Water Research*, 39(16), 3801–3810.
- Todini, O. y Pol, L. (1992). Anaerobic degradation of benzaldehyde in methanogenic granular sludge: the influence of additional substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 417–420.

- Tonouchi, A. (2004). Anaerobic 2-propanol degradation in anoxic paddy soil and the possible role of methanogens in its degradation. *Current Microbiology*, 49(2), 75–78.
- Upadhyay, U., Kumar, P. y Mehrotra, I. (2008). Anaerobic degradation of benzoate: batch studies. *Bioresource Technology*, 99(15), 6861–6865.
- Uyanik, S., Sallis, P. . y Anderson, G. . (2002). The effect of polymer addition on granulation in an anaerobic baffled reactor (ABR). Part I: process performance. *Water Research*, 36(4), 933–943.
- Vallero, D. (2006). *Paradigms Lost: Learning from Environmental Mistakes, Mishaps and Misdeeds*. Butterworth-Heinemann. Elsevier.
- Van den Berg, L. (1977). Effect of temperature on growth and activity of a methanogenic culture utilising acetate. *Canadian Journal of Microbiology*, 23(10), 898–902.
- Van Groenestijn, J. W. y Hesselink, P. G. M. (1993). Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation*, 4, 283–301.
- Van Hullebusch, E. D., Peerbolte, A., Zandvoort, M. H. y Lens, P. N. L. (2005). Sorption of cobalt and nickel on anaerobic granular sludges: isotherms and sequential extraction. *Chemosphere*, 58(4), 493–505.
- Van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H. y Lens, P. N. (2004). Nickel and cobalt sorption on anaerobic granular sludges: kinetic and equilibrium studies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(11), 1219–1227.
- Van Hullebusch, E. D. Van, Utomo, S., Zandvoort, M. H. y Lens, P. N. L. (2005). Comparison of three sequential extraction procedures to describe metal fractionation in anaerobic granular sludges. *Talanta*, 65(2), 549–558.
- Van Lier, J. B. (2008). High-rate anaerobic wastewater treatment: diversifying from end-of-the-pipe treatment to resource-oriented conversion techniques. *Water Science and Technology*, 57(8), 1137–1148.
- Van Lier, J. B., Tilche, A., Ahring, B. K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Hulshoff Pol, L. W., Lens, P. y Verstraete, W. (2001). New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science & Technology*, 43(1), 1–18.

- Van Schie, P. y Young, L. Y. (1998). Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2432–2438.
- Vermorel, N., Izquierdo, M., Gabaldón, C. y Peña-roja, J. M. (2015). Anaerobic biodegradation of binary mixtures of solvents from the packaging industry: inhibition and biodegradability studies. En: *IWA water & industry 2015*.
- Vlyssides, A., Barampouti, E. y Mai, S. (2009). Influence of ferrous iron on the granularity of a UASB reactor. *Chemical Engineering Journal*, 146(1), 49–56.
- Wark, K., Warner, C. F. y Davis, mWayne T. (1998). *Air Pollution: Its Origin And Control* (3rd ed., p. 573). Addison-Wesley.
- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 849–860.
- Widdel, F. (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1056–1062.
- Wiegant, W. M. y de Man, A. W. A. (1986). Granulation of Biomass in Thermophilic Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors Treating Acidified Wastewaters. *Biotechnology & Bioengineering*, 28, 718–727.
- Wu, W. M. y Jain, M. K. (1996). Formation of fatty acid-degrading, anaerobic granules by defined species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 2037–2044.
- Xiao, L., Chunjuan, D., Lv, B., Wang, Y. y Chen, S. (2008). Anaerobic treatment of domestic wastewater with EGSB reactor. En: *2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 2780–2783).
- Xing, W., Zuo, J.-E., Dai, N., Cheng, J. y Li, J. (2009). Reactor performance and microbial community of an EGSB reactor operated at 20 and 15 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 848–857.
- Yang, X., Balamurugan, S. y Gill, C. O. (2009). Substrate utilization by *Clostridium estertheticum* cultivated in meat juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 501–505.
- Yanti, H., Wikandari, R., Millati, R., Niklasson, C. y Taherzadeh, M. J. (2014). Effect of ester compounds on biogas production: beneficial or detrimental? *Energy Science & Engineering*, 2(1), 22–30.

- Young, J. C. y Mccarty, P. L. (1969). The anaerobic filter for waste treatment. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 41(5), 160–173.
- Yu, H. Q., Fang, H. H. P. y Tay, J. H. (2000). Effects of Fe²⁺ on sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Science & Technology*, 41(12), 199–206.
- Yu, H. Q., Fang, H. H. y Tay, J. H. (2001). Enhanced sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by aluminum chloride. *Chemosphere*, 44(1), 31–36.
- Yu, H. Q., Tay, J. H. y Fang, H. H. (2001). The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Research*, 35(4), 1052–1060.
- Zandvoort, M. H., van Hullebusch, E. D., Feroso, F. G. y Lens, P. N. L. (2006). Trace Metals in Anaerobic Granular Sludge Reactors: Bioavailability and Dosing Strategies. *Engineering in Life Sciences*, 6(3), 293–301.
- Zeeman, G., Sutter, K., Vens, T., Koster, M. y Wellinger, A. (1988). Psychrophilic digestion of dairy cattle and pig manure: start-up procedures of batch, fed-batch and CSTR-type digesters. *Biological Wastes*, 26(1), 15–31.
- Zellner, G. y Winter, J. (1987). Secondary alcohols as hydrogen donors for CO₂-reduction by methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 44, 323–328.
- Zhang, Y., An, X. y Quan, X. (2011). Enhancement of sludge granulation in a zero valence iron packed anaerobic reactor with a hydraulic circulation. *Process Biochemistry*, 46(2), 471–476.
- Zhao, Y., Boone, D. R., Mah, R. a., Boone, J. E. y Xun, L. (1989). Isolation and characterization of *Methanocorpusculum labreanum* sp. nov. from the LaBrea tar pits. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(1), 10–13.
- Zhou, W., Imai, T., Ukita, M., Sekine, M. y Higuchi, T. (2006). Triggering forces for anaerobic granulation in UASB reactors. *Process Biochemistry*, 41(1), 36–43.
- Zhu, J., Hu, J. y Gu, X. (1997). The bacterial numeration and an observation of a new syntrophic association for granular sludge. *Water Science and Technology*, 36(6-7), 133–140.
- Zinder, S. (1990). Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. *FEMS Microbiology Reviews*, 75, 125–137.

- Zinder, S. H. (1984). Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. *American Society of Microbiology News*, 50, 294–298.
- Zoutberg, G. y Debeen, P. (1997). The Biobed EGSB (expanded granular sludge bed) system covers shortcomings of the upflow anaerobic sludge blanket reactor in the chemical industry. *Water Science and Technology*, 35(10), 183–188.
- Zoutberg, G. y Frankin, R. (1996). Anaerobic treatment of chemical and brewery waste water with a new type of anaerobic reactor; the Biobed EGSB reactor. *Water Science and Technology*, 34(5-6), 375–381.