

 Escola Tècnica Superior d'Enginyeria

Departament d'Enginyeria Química



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

**ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE BIOMASA
GRANULAR EN EL TRATAMIENTO ANAEROBIO
DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN REACTORES
DE ALTA CARGA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA,
AMBIENTAL Y DE PROCESOS

Memoria que, para optar al Título de Doctora
por la Universitat de València, presenta
KEISY VANESSA TORRES RAMOS

Directores de tesis:
Dra. PAULA MARZAL DOMÉNECH
Dr. JAVIER ÁLVAREZ HORNOS

Valencia, noviembre de 2018

Dra. PAULA MARZAL DOMÉNECH, Profesora Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat de València, y

Dr. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ HORNOS, Profesor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat de València.

CERTIFICAN: Que **Dña. Keisy Vanessa Torres Ramos**, con Título de Ingeniería Química, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título de: **“Estudio de la formación de biomasa granular en el tratamiento anaerobio de disolventes orgánicos en reactores de alta carga”** presenta en esta Memoria y que constituye su Tesis para optar al Título de Doctora por la Universitat de València en el Programa de Doctorado en Ingeniería Química, Ambiental y de Procesos.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente certificado en

Valencia a ____ de _____ de 2018

Fdo.: Dra. Paula Marzal Doménech Fdo.: Dr. Francisco Javier Álvarez Hornos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores, Paula Marzal y Javier Álvarez, por su implicación y dedicación durante la realización de esta tesis doctoral. Su acompañamiento constante y sus valiosos aportes permitieron estructurar y mejorar el contenido de esta investigación.

Extiendo mi agradecimiento a Carmen Gabaldón por su acogida en el grupo de investigación GI²AM y por su contribución durante la elaboración de la tesis. También agradezco a los profesores que hacen parte del grupo, Vicente, Josep y Marta por su disposición para resolver cualquier inquietud en el transcurso de estos años.

Mi más sincero agradecimiento a mis compañeros de laboratorio. A Carlos, María, Dani y Nadine, por su amabilidad y su ayuda que, sin duda, facilitaron mi incorporación al grupo de investigación. A Pau, por su simpatía para compartir su experiencia y por su sencillez para aportar su conocimiento. A Pablo, Lidia y Alejo, que más que compañeros los considero mis amigos. Gracias por el buen ambiente en el laboratorio, por ser mis interlocutores, por compartir su cultura, por su paciencia, complicidad y apoyo. Su agradable compañía hizo que mi estancia en Valencia fuese amena a pesar de la ausencia familiar. A Pablo, en especial, agradezco la amabilidad y la dedicación para transferir su conocimiento, el cual fue valioso para la adquisición de habilidades que permitieron profundizar en esta investigación. A las nuevas incorporaciones, Helena y Miguel, les deseo éxitos en esta etapa de su formación académica y profesional.

Agradezco a mi familia la confianza y la motivación que me brindan para emprender cualquier proyecto, su paciencia ante la ausencia y su soporte emocional en la distancia. Gracias a Anderson, mi compañero de rutas existenciales, por su apoyo en los momentos aciagos y por la grata compañía en este viaje, que ya en su cúspide, se presenta como una gran aventura.

Finalmente, agradezco a la Generalitat Valenciana por la concesión de la beca Santiago Grisolí para la realización de esta investigación.

RESUMEN

La contaminación atmosférica constituye uno de los principales problemas medioambientales en la actualidad, afectando a los ecosistemas y a la salud de los seres humanos a nivel mundial. Los compuestos orgánicos volátiles (COV), emitidos principalmente a partir del uso de disolventes en procesos industriales, contribuyen de manera importante a la contaminación atmosférica, razón por la cual, las industrias emisoras deben ajustarse a la normativa vigente, reduciendo sus emisiones y aplicando técnicas de control para el tratamiento y la eliminación de estos contaminantes atmosféricos. Las tecnologías biológicas se han mostrado eficaces a nivel técnico y económico para la depuración de las emisiones de COV. Pese a ello, las tecnologías biológicas de mayor uso en la actualidad se fundamentan en procesos aerobios, requiriendo elevadas superficies para su instalación y presentando dificultades que limitan su aplicación generalizada a escala industrial. En este contexto, el grupo de investigación en Ingeniería Ambiental del departamento de Ingeniería Química de la Universitat de València ha desarrollado una tecnología novedosa de biolavador anaerobio para el tratamiento de emisiones de COV de alta solubilidad en colaboración con la compañía Pure Air Solutions B.V. En este proceso, previa absorción de los contaminantes gaseosos a una fase acuosa, el tratamiento de los COV se efectúa de acuerdo con los fundamentos de la depuración anaerobia de aguas residuales de origen industrial en reactores de alta carga, empleando para ello biomasa granular.

En este trabajo de tesis doctoral se presenta el estudio de la formación de biomasa granular en reactores de alta carga empleados para el tratamiento anaerobio de un agua residual sintética contaminada con disolventes orgánicos, específicamente, aquellos que son constituyentes principales de las emisiones de la industria flexográfica: etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol. Atendiendo a la necesidad imperativa de obtener un fango granular para que los reactores de alta carga operen adecuadamente, garantizando un alto tiempo de retención de sólidos y altas velocidades de degradación de los contaminantes orgánicos, en esta investigación se aborda el proceso de granulación anaerobia a partir de fangos en suspensión procedentes del digestor anaerobio de una estación depuradora de aguas residuales urbanas, evaluando los factores principales que inciden en la granulación. También se realiza la evaluación del proceso de degradación anaerobia de efluentes contaminados con la mezcla ternaria de disolventes orgánicos bajo diferentes condiciones de operación, y se lleva a cabo el análisis de las comunidades microbianas que participan en el proceso.

El contenido de la presente memoria inicia con el Capítulo 1, en el cual se contextualiza la problemática ambiental asociada a la emisión de COV. En este capítulo se describen las tecnologías de mayor uso en la actualidad para el tratamiento de las emisiones de COV, haciendo énfasis en el biolavador anaerobio. Se incluye una revisión bibliográfica acerca de los aspectos bioquímicos y microbiológicos del proceso de degradación anaerobia, así como una descripción de los reactores de alta carga y su aplicación para el tratamiento de disolventes orgánicos de interés industrial. En el Capítulo 2 se describe el proceso de granulación anaerobia, señalando el conocimiento existente sobre los mecanismos que dan lugar a este fenómeno natural y los factores que inciden en el proceso. Posteriormente, en el Capítulo 3, se presenta el objetivo de la tesis doctoral, el cual consiste en el estudio de la formación de biomasa granular en reactores anaerobios de alta carga a escala de laboratorio empleados para el tratamiento de un agua residual sintética contaminada con disolventes orgánicos de alta solubilidad en agua, e inoculados con un fango anaerobio en suspensión. En el Capítulo 4 se detallan los materiales y los métodos empleados para la realización del trabajo experimental.

La descripción de los estudios llevados a cabo junto con la metodología implementada, los resultados obtenidos y su discusión, se presentan a partir del Capítulo 5. En el Capítulo 5 se evalúa el efecto de la adición del polímero quitosano sobre la granulación de un fango en suspensión empleado como inóculo en un estudio comparativo llevado a cabo en tres reactores de alta carga con alimentación continua de un agua residual sintética contaminada con etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, operando bajo distintas condiciones de flujo y en ausencia de quitosano o con adición de dicho polímero. En este estudio, que tuvo una duración de 219 días, se evaluó la puesta en marcha y la operación de los reactores, atendiendo al rendimiento de la eliminación de la materia orgánica y la producción de metano, se evaluó la variación temporal del tamaño de partícula y se determinaron las características físicas y bioquímicas de la biomasa granular obtenida. El estudio de la formación de biomasa granular se complementó con el análisis de la dinámica de las comunidades microbianas mediante dos técnicas de biología molecular, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y secuenciación de alto rendimiento. Durante los ensayos se aplicaron cargas orgánicas volumétricas en el intervalo comprendido entre 0.6 y 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹. La adición de quitosano permitió disminuir el tiempo de adaptación del fango en suspensión para la degradación del agua residual sintética, alcanzándose eficacias de eliminación de la materia orgánica superiores al 92 % en tan sólo 11 días de

operación; mientras que en el reactor de control —sin adición de quitosano— la eficacia de eliminación fue del 84 % tras 22 días de operación. En los reactores asistidos con el polímero fue posible la aplicación de mayores cargas orgánicas en un menor tiempo, con una mayor estabilidad y con una producción específica de metano entre un 10 y un 12 % superior a la obtenida en el reactor de control. El análisis del efluente de los reactores mostró la menor velocidad de degradación del 1-etoxi-2-propanol respecto a los otros componentes de la mezcla terciaria, etanol y acetato de etilo, asociada a la escisión del enlace éter de glicol que actúa como etapa limitante.

En los tres sistemas se obtuvo la granulación del fango en suspensión. No obstante, la formación de biomasa granular tuvo lugar en un menor tiempo en los reactores con adición de quitosano. Los gránulos en estos sistemas presentaron velocidades de sedimentación entre 1.4 y 1.8 veces superiores a la de los gránulos del reactor de control, una mayor actividad metanogénica específica y una mayor producción de proteínas extracelulares. El aumento del tamaño de partícula mostró una relación directa con la producción de proteínas extracelulares. En el análisis de la variación temporal de las comunidades microbianas se encontró la predominancia de microorganismos capaces de realizar un metabolismo sintrófico. Los resultados indicaron que, inicialmente, la población de arqueas se vio afectada por el cambio en las condiciones ambientales y la exposición a los disolventes orgánicos. La afectación fue más notoria en el reactor de control, en el que la presencia de especies del género *Methanosaeta*, importantes en la formación y mantenimiento de gránulos anaerobios, disminuyó en mayor medida que en los reactores con quitosano. Las dos técnicas de biología molecular aplicadas permitieron determinar que los microorganismos predominantes en el fango granular de los tres reactores pertenecen a los géneros *Geobacter* y *Methanocorpusculum*. La presencia de este último microorganismo en alta abundancia sugirió su participación en la formación de gránulos, e indicó que la metanogénesis hidrogenotrófica fue una ruta metabólica importante para la producción de metano a partir de los disolventes orgánicos alimentados.

Parte de los resultados presentados en el Capítulo 5 han sido publicados en:

Torres, K., Álvarez-Hornos., F.J., San-Valero, P., Gabaldón, C., Marzal, P., 2018. Granulation and microbial community dynamics in the chitosan-supplemented anaerobic treatment of wastewater polluted with organic solvents. *Water Res.* **130**, 376-387.

Los sistemas de tratamiento industriales están sujetos a perturbaciones operacionales asociadas a la dinámica de los procesos productivos de la industria emisora. Dichas perturbaciones, entre las que se encuentran la variación del caudal y de la concentración de las emisiones, pueden afectar a la dinámica de las poblaciones microbianas, a la estabilidad del reactor y, en definitiva, a la eficacia del tratamiento. En el Capítulo 6 se evalúa el efecto de la alimentación intermitente del agua residual contaminada con disolventes orgánicos sobre el rendimiento de tres reactores de alta carga, sobre las características del fango granular y sobre la estructura de las comunidades microbianas. A fin de simular condiciones de operación típicas de las instalaciones industriales se estableció un patrón de alimentación de 16 horas al día durante 5 días a la semana. Uno de los reactores se operó con adición periódica de quitosano. Operando a una carga orgánica de hasta $50 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ se alcanzaron eficacias de eliminación superiores al 94 %, aunque con rendimientos de metano inferiores a los obtenidos en los ensayos con alimentación continua de agua residual. La capacidad de los reactores para alcanzar condiciones de pseudo-estado estacionario puso de manifiesto la robustez del tratamiento de efluentes contaminados con disolventes orgánicos con alimentación intermitente. La evaluación de la respuesta transitoria de los reactores a la reanudación de la alimentación del agua residual demostró una rápida recuperación de la actividad metanogénica después de los periodos de 8 horas sin alimentación de sustrato orgánico. Los periodos de interrupción de 56 horas afectaron en mayor medida a la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios, con una mayor concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente y menores rendimientos de metano. Asimismo, la alimentación intermitente del agua residual y la operación a altas cargas orgánicas afectaron a la integridad estructural de los gránulos, resultando en la flotación de éstos y en la oscilación del tamaño de partícula. La adición periódica de quitosano mejoró entre un 12 y un 15 % la actividad metanogénica específica del fango granular en comparación con los reactores a los que no se añadió el polímero.

La evaluación de las comunidades microbianas en los ensayos de operación con alimentación intermitente de agua residual reveló que se produjo una evolución hacia la predominancia de bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* capaces de ejercer un metabolismo sintrófico, con las especies del género *Geobacter* como las bacterias predominantes en los sistemas. Tal como en el inóculo de cada reactor, los metanógenos hidrogenotróficos del género *Methanocorpusculum* fueron abundantes.

El estudio presentado en el Capítulo 6 ha sido preparado para ser enviado a la revista *Bioresource Technology* (Torres, K., Álvarez-Hornos., F.J., San-Valero, P., Gabaldón, C., Marzal, P. Intermittent operation of UASB reactors treating wastewater polluted with organic solvents: process performance and microbial community evaluation. *Bioresour. Technol*, preparado para su envío).

Una vez evaluada la formación de biomasa granular con alimentación continua de sustrato orgánico y la posterior operación con alimentación intermitente, en el Capítulo 7 se abordó el estudio de la formación de biomasa granular en reactores de flujo ascendente operados, en este caso, con alimentación intermitente de agua residual. En este estudio se pusieron en marcha dos reactores con un patrón de alimentación de sustrato de 16 horas al día durante 7 días a la semana. En los ensayos se evaluó el efecto de la carga hidráulica sobre el proceso de granulación, operando un reactor con velocidades ascensionales del líquido entre 0.05 y 0.15 m h⁻¹, y otro con una velocidad ascensional de 3 m h⁻¹. Los ensayos se realizaron con adición periódica de quitosano a fin de reducir el tiempo requerido para la consecución de biomasa granular y la puesta en marcha de los reactores. Se evaluó la operación de los reactores, la evolución del tamaño de partícula y la estructura de las comunidades microbianas al finalizar el experimento. En ambos sistemas se efectuó el tratamiento de una carga orgánica máxima de 13 kg DQO m⁻³ d⁻¹, con eficacias de eliminación superiores al 90 %. El aporte intermitente de sustrato orgánico afectó al rendimiento de metano, siendo éste un aspecto a considerar para alcanzar la máxima recuperación posible del potencial energético derivado de la degradación de los disolventes orgánicos. La adición periódica de quitosano promovió la formación de biomasa granular. No obstante, se produjo un episodio de sobredosificación del polímero, resultando en la flotación de biomasa activa. Una velocidad ascensional superior no evidenció un mejor rendimiento, en cambio, pudo estar relacionada con la obtención de gránulos con un tamaño de partícula inferior y menos resistentes a las fuerzas de cizalladura. Respecto al análisis de la estructura de las comunidades microbianas, los microorganismos predominantes observadas en ambos reactores pertenecen a los géneros *Geobacter* y *Methanocorpusculum*. Operando con una velocidad ascensional inferior se observó una mayor abundancia de microorganismos sulfatoreductores del género *Desulfovibrio*.

En el Capítulo 7 se presenta, además, la comparación de la estructura de las comunidades microbianas del fango granular desarrollado en los diferentes experimentos en los que se utilizó quitosano como coadyuvante del proceso de granulación. Dicha comparación tuvo por objeto relacionar las comunidades

predominantes encontradas en los reactores con las diferentes condiciones operacionales fijadas y con el proceso de formación de biomasa granular. Se encontró que los microorganismos predominantes, aunque en abundancias relativas variables, se agrupan en los géneros *Methanocorpusculum*, *Geobacter* y *Desulfovibrio*, pese a que en los ensayos se utilizaron inóculos que, si bien procedían del mismo digestor, presentaron diferentes características, y a que se evaluaron condiciones operacionales diferentes, como el patrón de alimentación de agua residual y de sustrato orgánico, la carga orgánica, la concentración de materia orgánica en el afluente, el tiempo de retención hidráulico, la velocidad ascensional del líquido y la adición de quitosano. Estos resultados indicaron que la composición del agua residual determinó la presencia de las comunidades microbianas. La dominancia de microorganismos hidrogenotróficos indicó que la degradación del sustrato orgánico hasta metano se produjo, principalmente, a partir de interacciones sintróficas.

Finalmente, con el objetivo de evaluar otra estrategia para la consecución de biomasa granular, se realizó el estudio de la puesta en marcha de un reactor anaerobio inoculado con un fango en suspensión bajo alimentación continua de sustrato orgánico en presencia de esferas de alcohol polivinílico. En el estudio, presentado en el Capítulo 8, se utilizaron esferas de alcohol polivinílico con el objeto de proveer un material que actuara como bioportador para la formación de núcleos para el desarrollo de gránulos. La puesta en marcha del reactor se alcanzó tras 100 días, en los que se aplicaron cargas orgánicas en el intervalo comprendido entre 0.6 y 15 kg DQO m⁻³ d⁻¹, obteniendo eficacias de eliminación superiores al 90 %. Los resultados del seguimiento de las características del efluente del reactor y de la variación temporal del tamaño de partícula demostraron la desintegración de las esferas. No obstante, la metodología empleada para la puesta en marcha del reactor favoreció la formación rápida de biomasa granular, tal como lo indicó el incremento del tamaño medio de partícula desde 85 hasta 441 μm tras 30 días de operación. El análisis de las comunidades de bacterias mostró que el alginato, procedente de la desintegración de las esferas, pudo servir como fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos como *Dysgonomonas alginatilytica*.

Las conclusiones de la presente tesis doctoral se han presentado en cada uno de los capítulos correspondientes a resultados, y se compilan en el Capítulo 9 junto con las perspectivas de investigación en esta línea de trabajo.

ABSTRACT

Air pollution is one of the main environmental problems affecting the ecosystems and the human health worldwide. Volatile organic compounds (VOC), emitted mainly from the use of organic solvents in industrial processes, contribute significantly to air pollution. Therefore, the emitting industries must reduce their emissions and apply control techniques for the treatment and the elimination of these atmospheric pollutants, complying with current legislation. Biological technologies have proven to be technically and economically efficient for treating VOC emissions. Despite this, the currently used biological technologies are based on aerobic processes, requiring large area for their installation and presenting drawbacks that limit their widespread full-scale application. In this context, the research group in Environmental Engineering of the Department of Chemical Engineering of the University of Valencia has developed a novel technology of anaerobic bioscrubber for the treatment of highly soluble VOC in collaboration with the company Pure Air Solutions B.V. In this process, VOC are initially transferred from the gas phase to the liquid phase and afterwards they are degraded, following the anaerobic process for industrial wastewater treatment, in high rate anaerobic reactors using granular biomass.

This doctoral thesis studies the formation of granular biomass in high rate anaerobic reactors treating synthetic wastewater polluted with organic solvents, specifically, those that are main constituents of the flexographic industry air emissions: ethanol, ethyl acetate and 1-ethoxy-2-propanol. Due to the imperative need to obtain granular sludge for the proper operation of the high rate anaerobic reactors, allowing a high solids retention time and high degradation rates of the organic pollutants, this research addresses the evaluation of the anaerobic granulation process using suspended sludge from the anaerobic digester of a municipal wastewater treatment plant. The anaerobic degradation of wastewater polluted with the ternary mixture of organic solvents is also evaluated under different operational conditions, as well as the dynamic of the microbial communities involved.

Chapter 1 describes environmental problems related to VOC emissions and the most commonly used technologies for their treatment, with an emphasis on the anaerobic bioscrubber. A review of the biochemical and microbiological aspects of the anaerobic degradation process is included, as well as a description of the high

rate anaerobic reactors and their application for the treatment of wastewater polluted with organic solvents of industrial interest. Chapter 2 describes the anaerobic granulation process, pointing out the existing knowledge about the mechanisms that give rise to this natural phenomenon and the factors affecting it. Afterwards, Chapter 3 presents the objective of the doctoral thesis. The main purpose of the work is to study the formation of granular biomass in laboratory scale high rate anaerobic reactors treating synthetic wastewater contaminated with highly water soluble organic solvents, and inoculated with suspended anaerobic sludge. Chapter 4 details the materials and methods used to perform the experimental work. The methodology applied in each study is described in the corresponding chapter.

Chapter 5 presents results and discussion of the study of the effect of chitosan addition on the granulation of a suspended sludge used as inoculum of three anaerobic reactors continuously fed with a synthetic wastewater polluted with ethanol, ethyl acetate and 1-ethoxy-2-propanol, operating at different flow conditions and with the addition of the polymer or without it. The study lasted 219 days. The start-up and the operation of the reactors was evaluated according to the organic matter removal efficiency and the methane production. The particle size was evaluated over time and the physicochemical characteristics of the granular biomass developed were determined. The study of the formation of granular biomass was complemented with the analysis of the dynamics of the microbial communities using two molecular biology techniques. Organic loading rates in the range between 0.6 and 20 kg COD m⁻³ d⁻¹ were applied. The addition of chitosan allowed to reduce the adaptation time of the suspended sludge for the degradation of the wastewater, achieving removal efficiencies higher than 92 % after 11 days of operation; while in the control reactor —without the addition of chitosan— a removal efficiency of 84 % was obtained after 22 days of operation. In the reactors assisted with the polymer it was possible to apply higher organic loading rates in a shorter time, with greater stability and with a specific production of methane between 10 and 12 % higher than the obtained in the control reactor. The analysis of the effluent of the reactors showed the lowest degradation rate of 1-ethoxy-2-propanol compared to the other components of the tertiary mixture, ethanol and ethyl acetate. The lowest degradation rate was related to the ether cleavage that acts as the limiting step.

Granular biomass was developed in the three reactors. Nevertheless, the formation of granular biomass took place in a shorter time in the reactors assisted with chitosan. The granules in these systems exhibited higher settling velocities with

values 1.4 and 1.8 times higher than that of the granules of the control reactor, a higher specific methanogenic activity and a higher production of extracellular proteins. The increase in particle size showed a correlation with the production of extracellular proteins. The analysis of the microbial community dynamics showed the predominance of microorganisms able to perform a syntrophic metabolism. The results indicated that, initially, the archaea population was affected by the change in environmental conditions and the exposure to organic solvents. The affectation was more evident in the control reactor, in which the presence of species of the genus *Methanosaeta*, which are key microorganisms in the formation and maintenance of anaerobic granules, decreased to a greater extent than in the reactors assisted with chitosan. The two techniques of molecular biology applied allowed to determine that the microorganisms predominant in the granular sludge of the three reactors belong to the genera *Geobacter* and *Methanocorpusculum*. The presence of the last microorganism in high abundance in the three reactors suggested its participation in the formation of granules, and indicated that hydrogenotrophic methanogenesis was an important metabolic pathway for methane production from the organic solvents fed.

Some of the results presented in Chapter 5 have been published in the following paper:

Torres, K., Álvarez-Hornos., F.J., San-Valero, P., Gabaldón, C., Marzal, P., 2018. Granulation and microbial community dynamics in the chitosan-supplemented anaerobic treatment of wastewater polluted with organic solvents. *Water Res.* 130, 376-387.

Industrial treatment systems are subject to operational disturbances associated with the dynamics of the production processes at industrial facilities. These disturbances, such as variations in flow and concentration of the emissions, can affect the dynamics of the microbial populations, the stability of the reactor and, finally, the efficiency of the treatment. Chapter 6 evaluates the effect of intermittent feeding on the performance of three high rate anaerobic reactors treating wastewater polluted with organic solvents, on the characteristics of the granular sludge and on the structure of the microbial communities. In order to simulate typical operating conditions at industrial facilities, a feeding pattern of 16 hours per day during 5 days per week was applied. One of the reactors was operated with periodic addition of chitosan. Operating at an organic loading rate up to 50 kg COD m⁻³ d⁻¹, removal efficiencies greater than 94% were achieved, although

the methane yields were lower than those obtained in the assays carried out with continuous feeding of wastewater. The capacity of the reactors to reach pseudo-steady state conditions showed the robustness of the treatment. The evaluation of the transient response of the reactors to the resumption of the wastewater feeding showed a rapid recovery of the methanogenic activity after 8-hour periods without organic substrate supply. The interruption periods of 56 hours affected to a greater extent the metabolic activity of the anaerobic microorganisms, with a higher concentration of volatile fatty acids in the effluent and lower methane yields. Likewise, the intermittent feeding of the wastewater and the operation at high organic loading rates affected the structural integrity of the granules, resulting in the flotation of these and in the oscillation of the particle size distribution. The periodic addition of chitosan improved the specific methanogenic activity of the granular sludge between 12 and 15% compared to the reactors without the polymer.

The evaluation of the microbial communities in this study revealed that there was an evolution towards the predominance of bacteria capable of exerting a syntrophic metabolism belonging to the *Proteobacteria* phylum, with the species of the genus *Geobacter* as the predominant bacteria in the three reactors. As in the inoculum of each reactor, the hydrogenotrophic methanogens of the genus *Methanocorpusculum* were the most abundant.

The study presented in Chapter 6 has been prepared to be sent to *Bioresource Technology* journal (Torres, K., Álvarez-Hornos, F.J., San-Valero, P., Gabaldón, C., Marzal, P. Intermittent operation of UASB reactors treating wastewater polluted with organic solvents: process performance and microbial community evaluation, *Bioresour Technol*, prepared for sending).

After the evaluation of the granulation process under continuous feeding of organic substrate and the subsequent performance with intermittent feeding, Chapter 7 approaches the study of the formation of granular biomass in upflow anaerobic reactors operating, in this case, with intermittent feeding of wastewater. In this study, two reactors were started-up with a substrate feeding pattern of 16 hours per day during 7 days per week. In these assays the effect of the hydraulic load on the granulation process was evaluated, operating a reactor at upflow liquid velocities between 0.05 and 0.15 m h⁻¹, and another at an upflow liquid velocity of 3 m h⁻¹. The assays were carried out with periodic addition of chitosan in order to reduce the time required for the achievement of granular biomass and the start-up of the reactors. The performance of the reactors was evaluated together with the

evolution of the particle size distribution and the structure of the microbial communities at the end of the experiment. A maximum organic loading rate of 13 kg COD m⁻³ d⁻¹ was applied in both reactors, with removal efficiencies greater than 90 %. The intermittent supply of organic substrate affected the methane yield, this being an aspect to take into account in order to reach the maximum possible recovery of the energy derived from the degradation of organic solvents. The periodic addition of chitosan promoted the formation of granular biomass. However, there was an incident of the polymer overdose, resulting in the flotation of active biomass. A higher upflow liquid velocity did not show a better performance, instead of, could be related to the formation of granules with a smaller particle size and less resistant to shear forces. Regarding the analysis of the structure of microbial communities, the predominant microorganisms observed in both reactors belong to the genus *Geobacter* and *Methanocorpusculum*. Operating with a lower upflow velocity, a greater abundance of sulfate reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio* was observed.

Chapter 7 also presents the comparison of the structure of the microbial communities of the granular sludge developed in the different experiments performed with chitosan addition. The purpose of this comparison was to relate the predominant communities found in the reactors with the different operational conditions established and with the granulation process. It was found that the predominant microorganisms, although in variable relative abundances, are grouped in the genera *Methanocorpusculum*, *Geobacter* and *Desulfovibrio*, although the inocula of the assays presented different characteristics, and different operational conditions were evaluated, such as the pattern of wastewater and organic substrate supply, the organic loading rate, the concentration of substrate in the influent, the hydraulic retention time, the liquid upflow velocity and the addition of chitosan. These results indicated that the composition of the wastewater determined the presence of the microbial communities. The dominance of hydrogenotrophic microorganisms indicated that the degradation of the organic substrate to methane mainly occurred through syntrophic interactions.

Finally, in order to evaluate another strategy for the achievement of granular biomass, the study of the start-up of an anaerobic reactor inoculated with suspended sludge under continuous feeding of organic substrate in the presence of polyvinyl alcohol gel beads was carried out. In the study, presented in Chapter 8, polyvinyl alcohol gel beads were used to provide a material that could act as biocarrier for the formation of nuclei for the development of granules. The start-up

of the reactor was reached after 100 days, increasing the organic loading rate from 0.6 to 15 kg COD m⁻³ d⁻¹, achieving removal efficiencies higher than 90 %. The results of the effluent characteristics of the reactor and of the evolution of the particle size distribution showed the disintegration of the gel beads. However, the methodology used for the start-up of the reactor favored a rapid formation of granular biomass, such as the increase in the average particle size from 85 to 441 μm after 30 days of operation showed. The analysis of microbial communities showed that alginate, resulting from the disintegration of the gel beads, could serve as carbon source for the growth of bacteria as *Dysgonomonas alginatilytica*.

Conclusions of this doctoral thesis have been provided in each chapter of results and are summarized in Chapter 9 together with the future perspectives.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Tecnologías para el tratamiento de emisiones industriales de COV	6
1.2	Fundamentos del tratamiento anaerobio	12
1.2.1	Etapas del proceso de degradación anaerobia: aspectos bioquímicos y microbiológicos.....	13
1.2.2	Factores que inciden en el proceso de degradación anaerobia	24
1.3	Reactores anaerobios de alta carga	31
1.4	Tratamiento de disolventes orgánicos de interés industrial en reactores anaerobios de alta carga	37
2	PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOMASA GRANULAR	47
2.1	Teorías y mecanismos de granulación anaerobia	49
2.1.1	Teorías fisicoquímicas.....	51
2.1.2	Teorías estructurales y ecológicas	54
2.1.3	Teorías termodinámicas	57
2.2	Factores que influyen en el proceso de granulación	59
2.2.1	Características del inóculo	60
2.2.2	Características del agua residual	61
2.2.3	Carga orgánica	63
2.2.4	Velocidad ascensional y tiempo de retención hidráulico	64
2.2.5	Temperatura	65
2.2.6	Hidrofobicidad celular	65
2.2.7	Adición de cationes multivalentes, polímeros y materiales inertes... ..	66
2.3	Granulación en reactores de alta carga aplicados al tratamiento anaerobio de aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos	71
3	OBJETIVOS	77
4	MATERIALES Y MÉTODOS	81
4.1	Montaje experimental	83
4.2	Inóculo	85
4.3	Composición del agua residual sintética	86
4.4	Técnicas analíticas para el control y el seguimiento de los reactores	88
4.4.1	pH, temperatura y conductividad.....	88
4.4.2	Concentración de ácidos grasos volátiles y alcalinidad	88

4.4.3	Demanda química de oxígeno, carbono orgánico total y carbono inorgánico	89
4.4.4	Concentración de disolventes orgánicos	90
4.4.5	Contenido de sólidos	90
4.4.6	Concentración de nutrientes	91
4.4.7	Producción de metano y composición del biogás.....	91
4.4.8	Determinación de la concentración de metano disuelto	92
4.4.9	Características fisicoquímicas y bioquímicas del fango granular.....	93
4.5	Análisis de las comunidades microbianas.....	97
4.5.1	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante	97
4.5.2	Secuenciación de alto rendimiento	102
4.6	Ensayo de jar-test	103
4.6.1	Medición de la turbidez	104
4.6.2	Determinación del índice volumétrico de fangos.....	104
4.7	Elaboración de esferas de alcohol polivinílico	105
5	GRANULACIÓN EN REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN CONTINUA DE UN AGUA RESIDUAL CONTAMINADA CON DISOLVENTES ORGÁNICOS: EFECTO DE LA ADICIÓN DE QUITOSANO	107
5.1	Plan de trabajo	110
5.1.1	Determinación de la dosis óptima de quitosano	111
5.1.2	Puesta en marcha y operación de los reactores UASB	111
5.1.3	Evaluación de la variación de las características fisicoquímicas del fango granular.....	113
5.1.4	Análisis de las comunidades microbianas.....	114
5.2	Resultados y discusión	114
5.2.1	Determinación de la dosis óptima de quitosano	114
5.2.2	Operación de los reactores UASB	116
5.2.3	Formación de biomasa granular	129
5.2.4	Análisis de las comunidades microbianas.....	144
5.3	Conclusiones.....	158
6	TRATAMIENTO ANAEROBIO DE UN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA CONTAMINADA CON DISOLVENTES ORGÁNICOS EN CONDICIONES DE ALIMENTACIÓN INTERMITENTE	163
6.1	Plan de trabajo	166
6.1.1	Puesta en marcha y operación de los reactores UASB	167

6.1.2	Evaluación de las características del fango granular anaerobio.....	170
6.1.3	Análisis de las comunidades microbianas.....	171
6.2	Resultados y discusión	171
6.2.1	Operación de los reactores.....	171
6.2.2	Respuesta dinámica a la reanudación del suministro agua residual	181
6.2.3	Características fisicoquímicas de la biomasa anaerobia.....	184
6.2.4	Análisis de las comunidades microbianas.....	191
6.3	Conclusiones.....	202
7	FORMACIÓN DE BIOMASA GRANULAR EN REACTORES ANAEROBIOS ALIMENTADOS INTERMITENTEMENTE CON UN AGUA RESIDUAL CONTAMINADA CON DISOLVENTES ORGÁNICOS.....	205
7.1	Plan de trabajo	209
7.1.1	Determinación de la dosis óptima de quitosano	209
7.1.2	Puesta en marcha y operación de los reactores.....	209
7.1.3	Evaluación de la variación de las características fisicoquímicas del fango granular.....	213
7.1.4	Análisis de las comunidades microbianas.....	213
7.2	Resultados y discusión	213
7.2.1	Determinación de la dosis óptima de quitosano	213
7.2.2	Operación de los reactores.....	215
7.2.3	Respuesta dinámica ante la reanudación del suministro de disolventes orgánicos.....	230
7.2.4	Formación de biomasa granular	236
7.2.5	Estructura de las comunidades microbianas.	245
7.3	Estructura de las comunidades microbianas en reactores de alta carga bajo diferentes condiciones de operación	252
7.4	Conclusiones.....	256
8	ESTUDIO DE LA PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR UASB ALIMENTADO CON UN AGUA RESIDUAL CONTAMINADA CON DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE ESFERAS DE ALCOHOL POLIVINÍLICO	259
8.1	Plan de trabajo	262
8.1.1	Puesta en marcha y operación del reactor UASB	262
8.1.2	Evaluación de las características fisicoquímicas del fango anaerobio	263
8.1.3	Análisis de las comunidades microbianas.....	264

8.2 Resultados y discusión	264
8.2.1 Operación del reactor UASB	264
8.2.2 Formación de biomasa granular en presencia de esferas de PVA....	273
8.2.3 Análisis de las comunidades microbianas.....	281
8.3 Conclusiones.....	287
9 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	291
10 NOMENCLATURA.....	299
11 BIBLIOGRAFÍA	305

1 INTRODUCCIÓN

El control de la calidad del aire ha suscitado gran interés en las últimas décadas debido al efecto adverso de la contaminación atmosférica sobre el medioambiente y a su incidencia en el deterioro de la salud de los seres humanos. De acuerdo con la Organización Mundial de la salud (WHO, 2016), la contaminación atmosférica es responsable de 3 millones de defunciones anuales; así, una de cada nueve muertes es atribuible a condiciones relacionadas con la exposición a contaminantes atmosféricos. La contaminación atmosférica es un problema que afecta a todas las regiones, entornos y grupos socioeconómicos del mundo y, debido a que su incremento anual es alarmante, representa uno de los mayores riesgos ambientales para la salud.

En Europa, la implementación de políticas ambientales para la prevención y el control de las emisiones de contaminantes atmosféricos ha sentado principios para la mejora de la calidad del aire en toda la región. No obstante, persisten impactos considerables sobre la salud humana y el medio ambiente: una proporción importante de la población (en especial la que habita en zonas urbanas) y los ecosistemas continúan expuestos a niveles de contaminación atmosférica que exceden los estándares europeos y, en particular, las directrices establecidas por la OMS (EEA, 2016a). En este contexto, en el año 2014, 16 de los 28 estados miembros de la Unión Europea (UE-28) excedieron el valor objetivo de la concentración de ozono troposférico establecido por la UE para la protección de la salud humana, $120 \mu\text{g m}^{-3}$ (valor promedio máximo diario de 8 horas) y, menos del 4 % de las estaciones europeas registraron valores de conformidad con el límite determinado por la OMS, $100 \mu\text{g m}^{-3}$ (EEA, 2016a). El ozono troposférico puede causar asma y agravar otras enfermedades respiratorias como el enfisema y la bronquitis crónica, y ha sido asociado a daños pulmonares permanentes por exposición a largo plazo (USEPA, 2014). Se estima que en el año 2013 la exposición a corto plazo a este contaminante produjo alrededor de 17 000 defunciones prematuras en Europa (EEA, 2015). Puesto que la agencia Europea del Medio Ambiente prevé que para el año 2020 un 7 % de las estaciones continuarán registrando valores que exceden el valor establecido por la UE, se deben tomar medidas adicionales que permitan dar cumplimiento a los estándares actuales.

El ozono troposférico no se emite de manera directa a la atmósfera. Se trata de un contaminante secundario formado a partir de reacciones fotoquímicas entre contaminantes precursores: los óxidos de nitrógeno (NO_x) y los compuestos orgánicos volátiles (COV) de origen biogénico y antropogénico. Las reacciones

fotoquímicas que dan lugar a la formación del ozono troposférico son complejas y dependen de la luz solar, de factores geográficos y de la disponibilidad de los precursores, cuyas emisiones, en su mayoría, provienen de fuentes antropogénicas (WHO Regional Office for Europe, 2008). En Europa, uno de los principales sectores que contribuye a las emisiones atmosféricas de estos contaminantes es el sector industrial (EEA, 2017a; WHO Regional Office for Europe, 2008).

La Directiva 2010/75/UE, en la cual se recogen las directrices sobre la prevención y el control integrados de la contaminación procedente de actividades industriales, regula en la actualidad la emisión de los precursores del ozono troposférico. Centrándonos en los COV, en dicha directiva se definen como 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. Los COV, además de ser precursores del ozono troposférico, pueden causar efectos directos sobre la salud, tales como irritación conjuntival y nasal, dificultades respiratorias, cefaleas, mareos, náuseas, reacciones alérgicas de la piel; y ejercer efectos carcinógenos y mutagénicos por exposición a corto y largo plazo (Bernstein et al., 2008; Fiedler et al., 2005; Laurent y Hauschild, 2014).

Debido a que no todos los COV tienen la misma reactividad fotoquímica y, en virtud de ello, su efecto sobre el medio ambiente es diferente, se suele distinguir entre metano (CH_4) y compuestos orgánicos volátiles distintos de metano (COVNM), estos últimos con mayor contribución a la formación del ozono troposférico (Derwent, 1995). Las principales fuentes antropogénicas de emisiones de COVNM provienen de la combustión incompleta de combustibles fósiles, de pérdidas de combustible por evaporación, del uso de disolventes, de diversos procesos de producción industrial, de actividades agrícolas y de la combustión de biomasa (WHO Regional Office for Europe, 2008). En Europa, el sector de mayor contribución a las emisiones antropogénicas de COVNM es el sector de procesos industriales y uso de productos, el cual comprende el 50 % de las emisiones, e incluye aquellas derivadas de actividades no relacionadas con la combustión (EEA, 2017b). El uso de disolventes y otros productos representa la mayor fuente emisora de COVNM (EEA, 2017c).

Pese a que las emisiones de COVNM en la UE-28 han disminuido de manera significativa desde 1990, entre los años 2014 y 2015 se observó un ligero incremento

del 0.4 % adjudicado al aumento de las emisiones de algunos países, entre ellos España (EEA, 2017b). De acuerdo con el Inventario de Emisiones elaborado por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, las emisiones de COVNM aumentaron un 2.6 % a nivel nacional en 2015. En la Figura 1.1 se muestra la contribución de los diferentes sectores a las emisiones de COVNM en España en el año 2015. Estas emisiones están fundamentalmente dominadas por las actividades que utilizan disolventes (48 % del total de las emisiones). En España, las emisiones de COVNM derivadas del uso de disolventes han tenido un descenso notable desde el año 2003 como resultado de la entrada en vigor de medidas reguladoras tales como: la Directiva sobre las emisiones de COV debidas al uso de disolventes orgánicos (Directiva 1999/13/CE; derogada por la Directiva 2010/75/UE) y la directiva relativa a la limitación de disolventes orgánicos en determinadas pinturas y barnices y en los productos de renovación del acabado de vehículos (Directiva 2004/42/CE). El descenso en el consumo de pinturas por motivo de la recesión económica también ha propiciado la contracción de las emisiones de COV. No obstante, en el año 2015, se evidenció una recuperación del sector, lo cual supuso el aumento de sus emisiones en un valor del 2.7 % (MAPAMA, 2017).

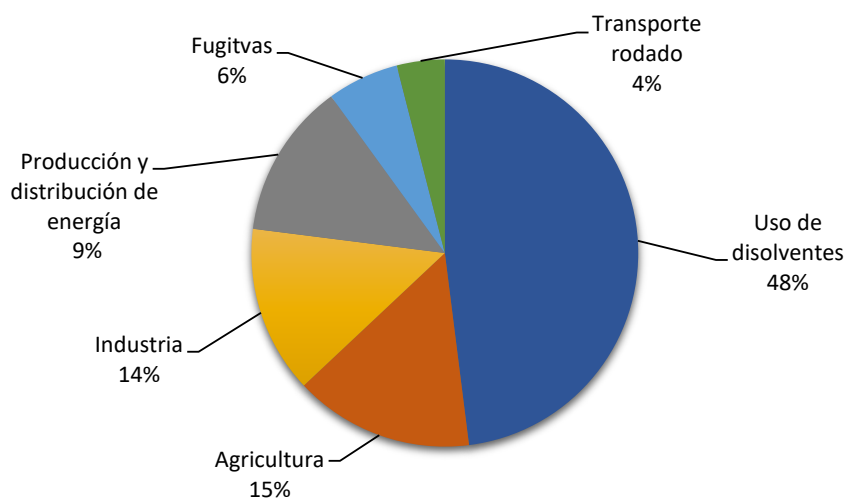


Figura 1.1. Contribución por sector a las emisiones de COVNM en España en el año 2015 (MAPAMA, 2017).

Los objetivos de control y reducción de emisiones de COV y otros precursores causantes de la acidificación, la eutrofización o el ozono troposférico han sido preceptuados en los países miembros de la UE mediante la Directiva sobre Techos

Nacionales de Emisiones (Directiva 2001/81/CE), derogada en diciembre de 2016 por la Directiva 2016/2284/EU relativa a la reducción de las emisiones nacionales de determinados contaminantes atmosféricos. La nueva directiva introduce límites más restrictivos para las emisiones de contaminantes atmosféricos, fijando para España un objetivo de reducción del 22 % de las emisiones de COVNM para los años comprendidos entre 2020 y 2029, con la emisión del año 2005 como referente, y ampliando el objetivo de reducción a partir del año 2030, estableciéndose éste en un 39 %. Esta reducción converge con los objetivos establecidos en la política europea sobre calidad del aire a largo plazo, de manera concreta con el programa “Aire Puro para Europa”, en el cual se prevé que, con la aplicación plena de la nueva directiva, los impactos sobre la salud sean reducidos un 52 % para el año 2030 y la superficie de los ecosistemas en la que se exceden los límites de eutrofización disminuya un 35 % para este mismo año. En este mismo programa se reconoce la demanda de tecnologías eficientes y el desarrollo de soluciones innovadoras para alcanzar los objetivos de mejora de la calidad del aire a largo plazo y, como consecuencia, oportunidades de crecimiento y competitividad para los sectores que ejercen sus actividades en el mercado de las tecnologías y los servicios ambientales.

La reducción de las emisiones industriales de COV se centra en la aplicación de medidas de prevención y de la disminución de la contaminación en origen, o en la implementación de técnicas de control asociadas al tratamiento de la corriente contaminante. Estas técnicas, llamadas técnicas de final de tubería o end of pipe, permiten la depuración de la corriente residual para su emisión al medio receptor. En la siguiente sección se describen de manera sucinta las tecnologías actuales para la depuración de emisiones industriales de COV, haciendo énfasis en las tecnologías biológicas.

1.1 TECNOLOGÍAS PARA EL TRATAMIENTO DE EMISIONES INDUSTRIALES DE COV

Las medidas de prevención y control de las emisiones industriales de COV suponen la aplicación de tecnologías efectivas que permitan obtener un elevado nivel de protección del medio ambiente tomando en consideración los costes y beneficios. En el ámbito europeo, las técnicas empleadas en la actualidad para el control de las emisiones industriales de COV se encuentran recogidas en el documento de referencia de las mejores técnicas disponibles (MTD), y pueden

clasificarse, de acuerdo con su naturaleza, en procesos fisicoquímicos: condensación, adsorción, absorción, incineración, oxidación catalítica o separación por membranas; o en procesos biológicos: biofiltros, biolavadores, biofiltros percoladores o biorreactores de membrana. La selección de la técnica más apropiada debe efectuarse en función de las características fisicoquímicas de los compuestos a depurar, el caudal y la concentración de COV en la corriente de interés, la eficacia de eliminación requerida y los límites de emisión y, atendiendo a otros criterios como costes de inversión, costes de operación e impactos sociales y ambientales.

Los tratamientos biológicos destacan sobre los métodos fisicoquímicos convencionales para la eliminación de COV de emisiones industriales en virtud de su eficacia, menor consumo de energía, menor impacto ambiental y facilidad de operación y mantenimiento (Cox y Russell, 2003; European Commission et al., 2014; van Groenestijn y Kraakman, 2005). En particular, los procesos biológicos son especialmente adecuados para el control de emisiones caracterizadas por bajas concentraciones de contaminante y elevados caudales (Delhoménie y Heitz, 2005; Deshusses et al., 1997), para las que no es factible implementar técnicas fisicoquímicas de recuperación debido al desequilibrio entre costes de energía y de operación en relación con el beneficio medioambiental que se deriva (Comisión Europea, 2009).

Los procesos biológicos se fundamentan en la capacidad de los microorganismos para metabolizar los COV de la corriente de interés, previa transferencia de los contaminantes desde la fase gaseosa hacia la fase acuosa biológicamente activa. En éstos, los COV se transforman en dióxido de carbono, agua y en otros productos inorgánicos y, en aplicaciones más recientes, en metano, contribuyendo al aprovechamiento y a la valorización de las corrientes residuales. La aplicación de los procesos biológicos de degradación se efectúa en diferentes configuraciones de reactor. Las configuraciones más consolidadas para la eliminación biológica de COV en la actualidad corresponden a biofiltros, biofiltros percoladores y biolavadores aerobios (Figura 1.2). Dichas configuraciones difieren en sus características técnicas y en el modo de operación del proceso biológico, es decir, el método de retención de los microorganismos, la disposición de las fases fluidas y la presencia o ausencia de fases estacionarias (Delhoménie y Heitz, 2005).

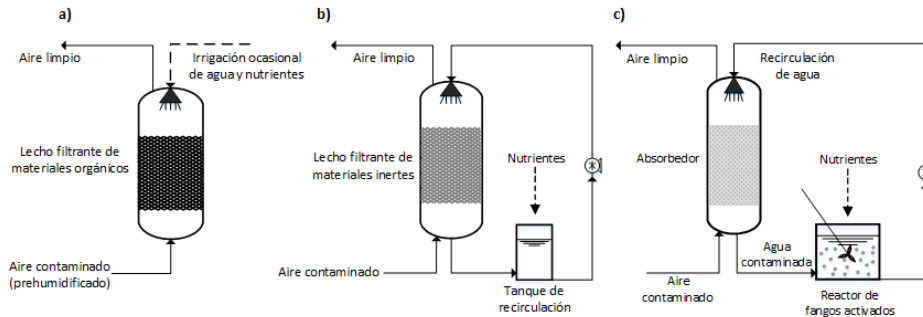


Figura 1.2. Esquema de las principales configuraciones de reactor para la eliminación biológica de COV: a) Biofiltro, b) Biofiltro Percolador y c) Biolavador aerobio.

Los biofiltros consisten en reactores de lecho fijo en los que una corriente húmeda de aire contaminado fluye a través de un material poroso (Figura 1.2a). Los microorganismos crecen adheridos a la superficie del material, el cual suele ser de origen natural, formando una biopelícula en la que se difunden los contaminantes para su degradación. Los costos de instalación y de operación de este tipo de sistemas son bajos respecto a los de las técnicas fisicoquímicas convencionales como la adsorción y la incineración catalítica. En condiciones óptimas de operación, se pueden obtener eficacias de eliminación superiores al 90 % (Rene et al., 2013). Una de las limitaciones de los biofiltros es el requerimiento de espacio para su instalación, que comparado con los procesos fisicoquímicos, es considerablemente mayor para el tratamiento de altos caudales (Rene et al., 2013). Además, debido a que los biofiltros convencionales operan sin alimentación continua de una fase líquida, el control de los parámetros operacionales como el pH, la humedad del material de soporte o el suministro de nutrientes puede ser difícil, y constituye el principal inconveniente en la aplicación de este tipo de tecnología.

En los biofiltros percoladores el control de los parámetros biológicos se subsana mediante la alimentación o recirculación de una fase acuosa que contiene los nutrientes que requiere el proceso biológico (Figura 1.2b). A medida que la corriente de aire pasa a través del material de relleno, los COV se absorben en la fase acuosa que rodea la biopelícula formada en las partículas del lecho, logrando un mayor contacto con la biomasa. En estos sistemas se emplean materiales de relleno sintéticos, generalmente plásticos estructurados o aleatorios. El principal inconveniente en la operación de los biofiltros percoladores está asociado a la acumulación de exceso de biomasa en el lecho filtrante y como consecuencia, al

aumento de pérdidas de presión, canalización y creación de zonas anaerobias, problemas operacionales que pueden conducir a la disminución de la eficacia del tratamiento tras un tiempo prolongado de operación. No obstante, se ha demostrado la efectividad de esta tecnología para el tratamiento de COV procedentes del uso de disolventes orgánicos a escala industrial con altas eficacias de eliminación tras tiempos prolongados de operación (San Valero, 2016; Sempere et al., 2012).

En los sistemas de biolavado se combinan los procesos de absorción y de crecimiento de biomasa en suspensión para efectuar la depuración de una corriente de aire contaminado con COV de alta solubilidad. Esta corriente pasa a través de una torre de absorción que transfiere los contaminantes a una fase líquida dispersa que fluye en sentido opuesto. La corriente líquida contaminada es conducida a un reactor biológico aireado y agitado, el cual contiene los microorganismos en suspensión y los nutrientes inorgánicos para su crecimiento y mantenimiento (Figura 1.2c). Una vez se reduce la concentración de COV en el reactor biológico, la corriente líquida se recircula a la torre de absorción. Estos sistemas permiten el tratamiento de altas cargas de aire contaminado contrastando con los biofiltros convencionales y los biofiltros percoladores (Kennes et al., 2009), posibilitan el control de los parámetros biológicos de operación y presentan una menor pérdida de presión. Las principales desventajas de esta configuración se encuentran en su restricción al tratamiento de COV altamente solubles en agua, la producción de biomasa en exceso y la baja disponibilidad de áreas superficiales específicas para la transferencia gas/líquido, pese a que la adición de materiales de relleno inertes a la torre de absorción aumenta la superficie de transferencia entre los COV y la fase acuosa (Delhoménie y Heitz, 2005).

Otras biotecnologías no convencionales para el tratamiento de emisiones de COV son los reactores de membrana y los contactores biológicos rotativos. Los resultados a escala de laboratorio de ambas tecnologías han demostrado que permiten el tratamiento de cargas orgánicas similares o mayores que los biofiltros convencionales o los biofiltros percoladores con altas eficacias de eliminación (Kumar et al., 2008; Ravi et al., 2010). No obstante, su aplicación a escala industrial aún es limitada (Kennes et al., 2009).

Pese a los avances realizados en cuanto al desarrollo de biotecnologías para la eliminación de compuestos orgánicos volátiles de emisiones industriales, los

sistemas referenciados están supeditados al proceso de degradación aerobia, y con ello, a sus limitaciones inherentes, tales como un gran requerimiento de área, producción de exceso de biomasa, obstrucción de lechos filtrantes y costes operacionales. Además, estos tratamientos biológicos se fundamentan en la oxidación completa de los COV, por lo cual no es posible su aprovechamiento. Estas limitaciones son especialmente importantes para industrias que presentan un elevado consumo de disolventes, lo que ha llevado al grupo de investigación GI²AM, en cuyo seno se ha realizado la presente investigación, al desarrollo de una nueva tecnología de biolavador anaerobio (Waalkens et al., 2015) en colaboración con la compañía Pure Air Solutions B.V.

El biolavador anaerobio consiste en un conjunto de operaciones unitarias en ciclo cerrado cuyos equipos fundamentales son: una torre de lavado que transfiere los contaminantes gaseosos a una fase acuosa, emitiendo así un bajo contenido de COV a la atmósfera, y un reactor anaerobio de tipo EGSB (Reactor granular de lecho expandido o Expanded Granular Sludge Bed por sus siglas en inglés) en el cual se lleva a cabo la degradación biológica de los COV contenidos en la corriente líquida, transformándolos en biogás, el cual puede ser utilizado como fuente de energía mientras la corriente líquida tratada retorna a la unidad de absorción. El biolavador anaerobio permite el tratamiento de mayores cargas orgánicas con una necesidad de superficie menor respecto a los tratamientos aerobios convencionales (Bravo, 2017). Además, puesto que en este sistema se conciben los COV como un recurso energético, constituye una alternativa a los procesos biológicos aerobios y permite reducir la huella de carbono de la industria emisora a la vez que se da cumplimiento a los límites de emisión establecidos en la normativa vigente. En este contexto, la introducción de la tecnología de biolavador anaerobio promueve el modelo de economía circular en las industrias que utilizan disolventes de alta solubilidad en agua, modelo promovido por la Comisión Europea que constituye una contribución esencial a los esfuerzos de la UE encaminados a lograr una economía sostenible (Comisión Europea, 2015).

El biolavador anaerobio ha sido concebido para el tratamiento de emisiones de COV de alta solubilidad, es decir, COV con constantes de Henry inferiores a 0.01. Entre los sectores industriales que emplean COV de alta solubilidad se encuentra el de flexografía, uno de los sectores de la industria de impresión. La flexografía es un proceso de impresión que utiliza un soporte de imagen de caucho o fotopolímeros elásticos con tintas líquidas que se secan mediante la evaporación de los disolventes

orgánicos que contienen (EEA, 2016b). Este proceso permite el uso de una variedad de materiales que incluye papel, tableros de plástico, films metálicos o celofán y se utiliza ampliamente para la fabricación de envases flexibles de la industria alimentaria. En este tipo de impresión, el uso de tintas en base disolventes se considera estándar debido a su facilidad de uso y a la calidad del producto final (Sempere et al., 2012); no obstante, las tintas en base agua tienen un uso regular en algunas aplicaciones como bolsas de papel y bolsas de plástico (EEA, 2016b). Las tintas en base disolventes de uso común en la industria flexográfica contienen compuestos oxigenados como etanol, acetato de etilo, isopropanol, 1-metoxi-2-propanol, 1-etoxi-2-propanol, acetato de isopropilo, metiletilcetona, n-butanol y varios ésteres (European Commission, 2007). El uso de estas tintas, la manipulación de las materias primas y las actividades de limpieza en las instalaciones industriales generan emisiones de aire contaminado caracterizadas por altos caudales y bajas concentraciones de COV (Sempere et al., 2012).

Recientemente, Bravo et al. (2017) han demostrado la efectividad de la aplicación del biolavador anaerobio para el tratamiento de las emisiones de una industria flexográfica en un prototipo industrial. En dicho prototipo se trataron emisiones de aire contaminadas con etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol (E2P), principalmente, con caudales de aire entre 184 y 1253 m³ h⁻¹ y una concentración promedio de 1126 ± 470 mg C Nm⁻³, alcanzando eficacias de eliminación del 93 ± 5 %, un rendimiento de metano de 0.32 Nm³ kg DQO⁻¹_{degradada} y un contenido de metano en la corriente de biogás del 94 ± 3 %.

Como se ha indicado, la tecnología de biolavador anaerobio se fundamenta en la transferencia de los COV desde la fase gaseosa a una fase acuosa, y en la aplicación del proceso de degradación anaerobia en reactores de lecho granular para el tratamiento de los contaminantes disueltos. Así, dicho tratamiento se efectúa de acuerdo con los fundamentos de la depuración anaerobia de aguas residuales de origen industrial. Si bien el uso del biolavador anaerobio para la depuración de COV derivados del uso de disolventes es un concepto innovador, en la bibliografía se han documentado algunos ejemplos de la degradación anaerobia de aguas residuales que contienen disolventes orgánicos de interés en la industria flexográfica, tales como alcoholes (Henry et al., 1996; Vermorel, 2017; Widdel et al., 1988), ésteres (Oktem et al., 2007) y éteres de glicol (Lafita, 2016; Vermorel, 2017; Ferrero et al., 2018). Uno de los inconvenientes que se ha puesto de manifiesto en la aplicación de reactores de lecho granular para el tratamiento de disolventes

orgánicos es la posible desintegración del fango granular. El efecto tóxico de algunos disolventes (Costa et al., 2009; Lu et al., 2015a), las interrupciones en la alimentación de la carga orgánica (Lafita et al., 2015) o la exposición a concentraciones altas de sustrato (Henry et al., 1996; Vermorel, 2017), pueden ocasionar el deterioro y la desintegración total de los gránulos y, como consecuencia, el lavado de biomasa y el descenso de la eficacia del tratamiento. La pérdida de biomasa implica la necesidad de reposición y con ello tiempo y costes adicionales asociados a la adquisición de fango granular, o a la granulación de un fango en suspensión para operar a las cargas orgánicas de interés con eficacias de eliminación altas. De hecho, en los trabajos de investigación de Lafita (2016) y Vermorel (2017), realizados en el grupo de investigación GI²AM, se ha señalado la necesidad de profundizar en los parámetros involucrados en la desintegración de la biomasa granular en reactores anaerobios de lecho granular alimentados con aguas residuales contaminadas con disolventes de uso industrial. Además, desde el punto de vista industrial resulta de gran interés investigar la formación de biomasa granular a partir de fangos en suspensión, que son inóculos de fácil adquisición frente a los inóculos granulares, para la puesta en marcha de reactores anaerobios. Los problemas concernientes a la formación, retención y desintegración de biomasa granular deben considerarse para la aplicación efectiva de la tecnología de biolavador anaerobio en el tratamiento de COV procedentes del uso de disolventes orgánicos. La elucidación de tales inconvenientes y el estudio de la puesta en marcha de reactores anaerobios aplicados al tratamiento de un agua residual contaminada con disolventes orgánicos de interés en la industria flexográfica, fundamenta la realización de la presente tesis doctoral.

1.2 FUNDAMENTOS DEL TRATAMIENTO ANAEROBIO

Los sistemas de tratamiento anaerobio constituyen una tecnología bien consolidada para el control de la contaminación de aguas residuales industriales (van Lier et al., 2008). El menor requerimiento de espacio para efectuar el tratamiento de altas cargas orgánicas de manera eficaz, la menor producción de biomasa en exceso y el balance energético positivo de su operación en comparación con los procesos aerobios convencionales, son aspectos que confieren a los sistemas anaerobios la denominación de tecnologías sostenibles (Show et al., 2010). Considerando las limitaciones inherentes a los sistemas de biológicos expuestas en la sección anterior, el tratamiento anaerobio se presenta como una alternativa

factible para el tratamiento de COV de alta solubilidad. En esta sección se describe el proceso de degradación anaerobia y los aspectos fundamentales de su aplicación para el tratamiento de aguas residuales de origen industrial.

1.2.1 Etapas del proceso de degradación anaerobia: aspectos bioquímicos y microbiológicos

El balance energético positivo de los sistemas anaerobios procede de la generación de energía en forma de metano. En condiciones anaerobias, la materia orgánica se convierte en metano produciendo aproximadamente 13.5 MJ CH₄ kg DQO⁻¹_{eliminada} de energía térmica, lo cual supone una producción de energía eléctrica de 1.5 kWh (asumiendo un 40 % de eficiencia en la conversión) (van Lier et al., 2015), y por tanto, un valor añadido respecto a los sistemas de tratamiento aerobio.

En ambientes metanogénicos, la materia orgánica es degradada en ausencia de aceptores de electrones inorgánicos como oxígeno, sulfato o nitrato por diferentes grupos de microorganismos que realizan un conjunto de transformaciones bioquímicas, las cuales se pueden agrupar en cuatro etapas de acuerdo con los productos obtenidos: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Dichas transformaciones tienen lugar mediante reacciones fermentativas y de oxidación anaerobia con protones o bicarbonato como aceptores de electrones, las cuales ocurren de manera consecutiva y en paralelo, y que forman parte de las rutas metabólicas que los microorganismos efectúan para la obtención de energía en forma de ATP. En la Figura 1.3 se ilustran las etapas que conforman el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica compleja y los microorganismos involucrados. En primera instancia, las bacterias fermentativas hidrolizan las moléculas orgánicas complejas a monómeros solubles. Posteriormente, dichos monómeros se fermentan u oxidan de manera anaerobia a ácidos grasos de cadena corta, etanol, lactato, amonio y a compuestos que pueden ser utilizados directamente por los microorganismos metanogénicos (hidrógeno, formiato y acetato). En la siguiente etapa, las bacterias acetogénicas oxidan los compuestos orgánicos reducidos, diferentes al ácido acético, a hidrógeno, formiato y acetato, productos que en la etapa final del proceso son convertidos en dióxido de carbono y en metano por los microorganismos metanogénicos. En los siguientes apartados se describen con mayor detalle las diferentes etapas y subprocesos que conforman el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica.

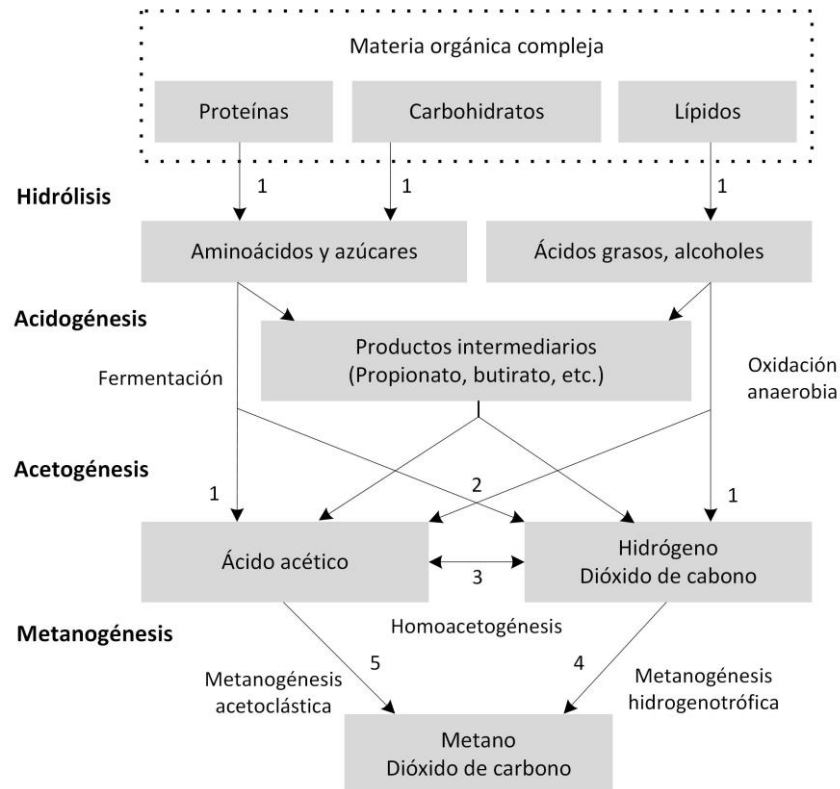


Figura 1.3. Esquema simplificado del proceso de degradación anaerobia. Los números indican los grupos de microorganismos implicados en las reacciones. 1. Bacterias hidrolíticas y fermentativas. 2. Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno. 3. Bacterias acetogénicas consumidoras de hidrógeno. 4. Metanógenos hidrogenotróficos 5. Metanógenos acetoclásticos (adaptada de van Lier et al., 2008).

Hidrólisis

La etapa de hidrólisis consiste en la conversión de moléculas orgánicas complejas como carbohidratos, proteínas y lípidos en moléculas más simples que pueden atravesar la membrana celular de las bacterias fermentativas o acidogénicas. Las moléculas orgánicas complejas se hidrolizan mediante la acción de enzimas extracelulares que secretan las bacterias hidrolíticas-fermentativas. Las proteasas catalizan la hidrólisis extracelular de proteínas a polipéptidos y a aminoácidos. Por su parte, los polisacáridos se hidrolizan a azúcares simples

mediante la acción de enzimas glucosidasas; mientras la hidrólisis de lípidos es realizada por lipasas, enzimas que catalizan la escisión de los enlaces éter que unen los ácidos grasos de cadena larga al glicerol, siendo estos los productos que se obtienen. Los productos de la etapa hidrolítica constituyen el sustrato de las bacterias acidogénicas. En el tratamiento de corrientes con un alto contenido de sólidos, la hidrólisis se considera la etapa limitante en la producción de biogás (Azman et al., 2015; Pavlostathis y Giraldo-Gomez, 1991) debido a la poca disponibilidad de superficies libres accesibles para las reacciones enzimáticas y a la estructura química del material particulado (van Lier et al., 2008).

Acidogénesis

En esta etapa del proceso de degradación, los productos solubles obtenidos en las reacciones hidrolíticas se convierten en una variedad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, principalmente ácidos grasos volátiles de cadena corta de más de dos átomos de carbono, es decir, ácido propiónico y ácido butírico, así como alcoholes, ácido láctico, amonio, dióxido de carbono, y los precursores directos de la formación de metano: ácido acético e hidrógeno (Figura 1.3). Las bacterias acidogénicas degradan los aminoácidos y los azúcares mediante reacciones en las que los compuestos orgánicos sirven como donadores y aceptores de electrones, es decir, reacciones fermentativas, cuyos productos principales, como se ha mencionado previamente, son ácidos grasos volátiles de más de dos carbonos. La degradación de los ácidos grasos de cadena larga, productos de la hidrólisis de lípidos, tiene lugar mediante reacciones de oxidación anaerobia que, atendiendo a la definición de Gujer y Zehnder (1983), corresponde al proceso microbiano en el que el hidrógeno es el principal sumidero de electrones. En este tipo de reacciones, realizadas por las bacterias acetogénicas, el ácido acético es el principal producto.

Los productos finales del metabolismo de las bacterias acidogénicas dependen del tipo de sustrato y de las condiciones ambientales del sistema, en especial, de la presión parcial del hidrógeno. En lo que respecta a la fermentación de azúcares, ésta se produce principalmente por la ruta Embden-Meyerhof-Parnas a piruvato, generando electrones que reducen los portadores primarios de electrones, como NADH (McInerney y Bryant, 1981). Los productos principales de la fermentación de azúcares son etanol, lactato, ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono e hidrógeno. El producto final depende de cómo las bacterias fermentativas metabolizan el piruvato y de la transferencia de hidrógeno entre éstas y los

microorganismos consumidores de hidrógeno. Esta interacción sintrófica, denominada transferencia de hidrógeno entre especies, permite mantener la presión parcial de hidrógeno en niveles bajos, aumentando así el potencial de reducción de la reacción H^+/H_2 . Cuando los microorganismos hidrogenotróficos consumen de manera eficiente el hidrógeno manteniendo la presión parcial en niveles bajos, las bacterias fermentativas producen hidrógeno a partir de la oxidación del mediador redox NADH. Dicha producción permite que el piruvato se degrade hasta dióxido de carbono, hidrógeno y acetato, siendo éste el producto principal de la fermentación de azúcares. Ahora bien, si el hidrógeno se acumula en el sistema, el NADH es oxidado para producir compuestos más reducidos como propionato, butirato e incluso lactato y etanol a partir del piruvato (McInerney y Bryant, 1981; Pavlostathis y Giraldo-Gomez, 1991). El crecimiento en sintrofia de las bacterias fermentativas con microorganismos hidrogenotróficos resulta en la obtención de mayores cantidades de ATP (Stams y Plugge, 2009)

En cuanto a los productos principales de la fermentación de aminoácidos, éstos son, generalmente, ácidos grasos volátiles de cadena corta, dióxido de carbono, hidrógeno y amonio. La fermentación de aminoácidos procede mediante dos rutas metabólicas principales (Li et al., 2017): 1) la reacción Stickland, en la que pares de aminoácidos se convierten en ácidos grasos volátiles e hidrógeno en reacciones de óxido-reducción; el aminoácido que actúa como donador de electrones se oxida hasta un ácido volátil con un átomo de carbono menos que el aminoácido original, mientras que el aminoácido que actúa como aceptor de electrones se reduce hasta un ácido volátil con el mismo número de átomos de carbono que el aminoácido original y, 2) mediante la degradación de un solo aminoácido en asociación sintrófica con microorganismos consumidores de hidrógeno. En el tratamiento de aguas residuales que contienen proteínas, las bacterias fermentativas degradan los aminoácidos de manera preferente mediante reacciones de Stickland (Ramsay y Pullammanappallil, 2001); mientras que la degradación sintrófica domina en entornos donde la concentración de aminoácidos es baja (Morris et al., 2013). Un aspecto importante de la degradación anaerobia de los aminoácidos es la liberación de NH_3 , el cual puede actuar como aceptor de electrones y puede conducir al aumento del pH del medio. Además, la alta concentración de NH_3 resultante de la degradación de aminoácidos puede resultar inhibitoria para los microorganismos metanogénicos (Li et al., 2017; Westerholm et al., 2011).

Las bacterias que llevan a cabo la hidrólisis y la fermentación de la materia orgánica comprenden un grupo diverso de microorganismos facultativos y anaerobios estrictos, siendo estos últimos más abundantes en reactores anaerobios. En general, se ha indicado que bacterias anaerobias estrictas como *Bacteroides*, *Clostridia*, *Bifidobacteria*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y bacterias pertenecientes a la familia *Porphyromonadaceae* realizan las reacciones hidrolíticas-fermentativas más importantes (Aydin, 2016; Grady et al., 2011; McInerney y Bryant, 1981; Wang et al., 2015). No obstante, la naturaleza del sustrato es determinante para la predominancia de los microorganismos en el sistema (Grady et al., 2011). Entre los organismos facultativos que se han identificado en sistemas de tratamiento de aguas residuales se encuentran *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Achromobacter* (Show et al., 2010).

Como se mencionó previamente, la degradación de los ácidos grasos de cadena larga procede mediante reacciones de oxidación anaerobia en la que el ácido acético es el producto principal. Así pues, la degradación de estos productos de la hidrólisis de lípidos se aborda en el siguiente apartado, la acetogénesis.

Acetogénesis

En la tercera etapa del proceso de degradación anaerobia, la acetogénesis, las bacterias acetogénicas convierten los productos intermedios obtenidos en la etapa acidogénica, ácidos grasos volátiles de cadena corta (excepto el ácido acético), alcoholes, algunos compuestos aromáticos y los ácidos grasos de cadena larga, en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono. La producción de ácido acético tiene lugar de acuerdo con dos mecanismos distintos: deshidrogenación acetogénica e hidrogenación acetogénica u homoacetogénesis.

La deshidrogenación acetogénica hace referencia a la oxidación anaerobia de alcoholes, ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos volátiles de cadena corta para la formación de ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno (Figura 1.3). Los sustratos acetogénicos más importantes son el propionato y el butirato, (van Lier et al., 2008). Se conocen dos rutas metabólicas para la degradación del propionato, la ruta metilmalonil-CoA y la de dismutación. La mayoría de las bacterias capaces de oxidar el propionato utilizan la ruta de metilmalonil-CoA para convertir este compuesto en acetato, dióxido de carbono e hidrógeno o formiato (de Bok et al., 2004). Las bacterias sintróficas como *Syntrophobacter*, *Pelotomaculum* y

Desulfotomaculum han sido descritas como microorganismos capaces de efectuar la oxidación de propionato (McInerney et al., 2008). La ruta de dismutación, en la que dos moléculas de propionato se convierten en acetato y butirato, sólo se ha identificado en el microorganismo sintrófico *Smithella propionica* (Liu et al., 1999). El butirato, así como los ácidos grasos de cadena larga, se degradan mediante la ruta denominada β -oxidación, un proceso cíclico en el cual los grupos acetyl de la cadena alifática de los ácidos grasos se escinden produciendo acetato e hidrógeno, principalmente. La oxidación de ácidos grasos de cadena larga con un número impar de carbonos produce, además de acetato, propionato (van Lier et al., 2008). Especies sintróficas pertenecientes a los géneros *Syntrophomonas*, *Syntrophus* y *Syntrophothermus* realizan la oxidación anaerobia del butirato y algunos ácidos grasos de cadena larga en asociación con microorganismos hidrogenotróficos como *Methanospirillum*, *Methanobacterium*, *Methanothermobacter* y *Desulfovibrio* (Stams et al., 2012).

Las bacterias acetogénicas son productoras obligadas de hidrógeno y su metabolismo es inhibido por concentraciones altas de este producto. Estos microorganismos sólo son capaces de efectuar la deshidrogenación acetogénica cuando el hidrógeno producido es consumido de manera eficiente por los microorganismos hidrogenotróficos. Por lo tanto, la oxidación anaerobia de los sustratos acetogénicos requiere de interacciones sintróficas obligadas (Stams, 1994). En este sentido, en la Tabla 1.1 se muestra el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG°) de algunas reacciones acetogénicas sin y con la asociación sintrófica con microorganismos metanogénicos consumidores de hidrógeno. Como se observa en dicha tabla, bajo condiciones estándar ($T = 298.15$ K, $pH = 7$, $P = 1$ atm para gases, 1M para solutos) las reacciones acetogénicas no son termodinámicamente favorables, tal como indica el valor positivo de ΔG° . No obstante, en condiciones en las que la presión parcial de hidrógeno es inferior a 10^{-4} atm, las reacciones acetogénicas son termodinámicamente favorables y pueden proceder (Grady et al., 2011; Stams, 1994). En los reactores metanogénicos la asociación sintrófica de las bacterias acetogénicas con los metanógenos hidrogenotróficos deriva en presiones parciales de hidrógeno bajas, lo cual permite la conversión de los sustratos acetogénicos y la formación de CH_4 (Tabla 1.1). Esta asociación sintrófica, que procede mediante el mecanismo de transferencia de hidrógeno entre especies, es esencial para la conversión de los sustratos acetogénicos y para evitar la inhibición del proceso, ya que en la oxidación anaerobia de éstos se producen grandes cantidades de hidrógeno como resultado de la transferencia directa de electrones

desde los portadores (NADH y FADH₂) a los protones. En condiciones adecuadas de operación, la presión parcial de hidrógeno de un reactor metanogénico no debe exceder un valor de 10⁻⁴ atm, y generalmente se encuentra entre 10⁻⁴ y 10⁻⁶ atm (van Lier et al., 2008).

Tabla 1.1. Algunas reacciones acetogénicas y su energía libre de Gibbs (adaptada de McInerney, 2001).

Reacción	ΔG° (kJ reacción ⁻¹)
Metanogénesis hidrogenotrófica	
$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.6 (1.1)
Reacción acetogénica sin el consumo de H ₂ por parte de metanógenos	
Lactato	
$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-4.2 (1.2)
Etanol	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9.6 (1.3)
Butirato	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+48.3 (1.4)
Propionato	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	+76.1 (1.5)
Reacción sintrófica acoplada al consumo de hidrógeno por parte de metanógenos	
$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{CH}_4 + 2\text{H}_2$	-143.6 (1.6)
$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{HCO}_3^- \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_4 + \text{H}^+$	-116.4 (1.7)
$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_4 + \text{H}^+$	-39.4 (1.8)
$4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{CH}_4 + \text{H}^+$	-102.4 (1.9)

En cuanto a los microorganismos capaces de ejercer un metabolismo sintrófico, la comparación de las secuencias del ácido ribonucleico ribosómico 16S (ARNr 16S), o de los genes que lo codifican, ha permitido establecer que la mayoría de estos microorganismos se agrupan en especies pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria* y a las bacterias gram positivas de bajo contenido en guanina y

citosa (G+C) (McInerney et al., 2008). Los géneros que agrupan especies sintróficas dentro de la clase *Deltaproteobacteria* son *Syntrophus*, *Syntrophobacter*, *Desulfoglaeba*, *Geobacter*, *Desulfovibrio* y *Pelobacter*. Dentro de las bacterias gram positivas de bajo contenido en G+C se distinguen dos grupos que realizan un metabolismo sintrófico. El primer grupo se compone por especies pertenecientes a los géneros *Desulfotomaculum*, *Syntrophobotulus*, *Sporotomaculum* y *Pelotomaculum*. La familia *Syntrophomonadaceae* conforma el segundo grupo e incluye especies de los géneros *Syntrophomonas*, *Syntrophothermus* y *Thermosyntropha* (McInerney et al., 2008).

En la hidrogenación acetogénica u homoacetogénesis, las bacterias homoacetogénicas producen ácido acético a partir de la reducción de dióxido de carbono, con hidrógeno como donador de electrones (Figura 1.3), a través de la ruta metabólica de Wood-Ljungdahl (Spirito et al., 2014). El formiato, el monóxido de carbono o el metanol, son otros sustratos utilizados para la formación de ácido acético. Las bacterias homoacetogénicas pueden competir con los metanógenos hidrogenotróficos por el hidrógeno del medio, siendo la homoacetogénesis más favorable energéticamente a presiones altas de hidrógeno y a bajas temperaturas (Chong et al., 2012; Conrad y Wetter, 1990; Spirito et al., 2014). Las bacterias homoacetogénicas bien caracterizadas se encuentran dentro de los géneros *Clostridium* y *Acetobacterium*. No obstante, los miembros de muchos otros géneros, pueden realizar la hidrogenación acetogénica, entre ellos *Moorella* y *Sporomusa* (Spirito et al., 2014). Entre las pocas bacterias que emplean monóxido de carbono para la formación de ácido acético se encuentran *Peptostreptococcus productus* y *Eubacterium limosum*. Esta última bacteria, además, puede utilizar metanol o compuestos aromáticos metoxilados para la producción de ácido acético (Diekert y Wohlfarth, 1994).

Metanogénesis

La metanogénesis es la última etapa en el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica (Figura 1.3). En ésta, las arqueas metanogénicas generan metano y dióxido de carbono a partir de un número limitado de sustratos, entre ellos acetato, dióxido de carbono-hidrógeno, formiato, metanol, metilaminas, o monóxido de carbono. De acuerdo con el sustrato que utilizan para la producción de metano, los microorganismos metanogénicos se clasifican en metanógenos acetotróficos o consumidores de ácido acético, dando lugar a la metanogénesis

acetoclástica; en metanógenos hidrogenotróficos, los cuales forman metano a partir de la reducción del CO₂ con hidrógeno o formiato como donadores de electrones en la denominada metanogénesis hidrogenotrófica; y en metanógenos metilotróficos, que reducen el grupo metilo de ciertos compuestos para la producción de metano (metanogénesis metilotrófica). En la Tabla 1.2 se presentan algunas reacciones metanogénicas según el tipo de sustrato utilizado y los microorganismos involucrados.

Tabla 1.2. Reacciones metanogénicas según el tipo de sustrato y los microorganismos metanogénicos involucrados (adaptada de Liu y Whitman, 2008).

Reacción metanogénica	Microorganismos involucrados
Ácido acético	
$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	<i>Methanosarcina</i> y <i>Methanosaeta</i>
CO₂	
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	La mayoría de los metanógenos
$4\text{CHOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	Muchos metanógenos hidrogenotróficos
$\text{CO}_2 + 4\text{C}_3\text{H}_8\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 4\text{C}_3\text{H}_6\text{O} + 2\text{H}_2\text{O}$	Algunos metanógenos hidrogenotróficos como <i>Methanobacterium formicicum</i>
$4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	<i>Methanothermobacter</i> y <i>Methanosarcina</i>
Compuestos con grupo metilo	
$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Methanosarcina</i> y otros metanógenos metilotróficos
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Methanosphaera</i> y <i>Methanomicrococcus blatticola</i>

Los microorganismos metanogénicos son filogenéticamente diversos pese a degradar un número limitado de sustratos. Éstos se clasifican en cinco órdenes: *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacterales*, *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales*. En ambientes anaerobios es común la interacción de miembros pertenecientes a los tres últimos órdenes con bacterias anaerobias para la degradación de la materia orgánica (Stams y Plugge, 2009).

En la metanogénesis acetoclástica los metanógenos utilizan el ácido acético para la producción de metano. El ácido acético es el precursor de aproximadamente dos tercios del metano que se produce en los reactores anaerobios (Grady et al.,

2011; Jetten et al., 1992); no obstante, sólo dos géneros de arqueas metanogénicas emplean este sustrato para la formación de metano: *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (Smith y Ingram-Smith, 2007), ambos pertenecientes al orden *Methanosarcinales*. Estos microorganismos realizan la escisión del ácido acético para oxidar el grupo carboxilo a dióxido de carbono y reducir el grupo metilo a metano (Liu y Whitman, 2008), y difieren en su metabolismo y en los mecanismos de conservación de energía. Las especies del género *Methanosarcina* son metabólicamente versátiles. Además del ácido acético, pueden degradar H_2 - CO_2 , metilaminas, metanol y formiato. En contraste, las especies del género *Methanosaeta* son especialistas que sólo utilizan ácido acético para la formación de metano (Smith y Ingram-Smith, 2007). Otra diferencia que presentan estos microorganismos son las enzimas que catalizan la primera etapa de la formación de metano, la cual consiste en la activación del ácido acético a acetil-CoA. *Methanosarcina* activa el ácido acético mediante las enzimas acetato quinasa y fosfato acetiltransferasa, mientras que *Methanosaeta* realiza la activación mediante la enzima acetil-CoA sintetasa (Jetten et al., 1992). En cuanto a las características cinéticas, *Methanosarcina* presenta una velocidad de crecimiento alta y una afinidad baja por el ácido acético. Para su crecimiento se requieren concentraciones mínimas de ácido acético entre 0.2 y 1.2 mM. En contraste, *Methanosaeta* presenta una velocidad de crecimiento baja y una alta afinidad por el sustrato; el umbral mínimo para la utilización de ácido acético es mucho más bajo, 7 - 70 μ M (Jetten et al., 1992; McInerney, 2001). Por ello, en sistemas de tratamiento de aguas residuales en los que la concentración de ácido acético en el efluente es baja, *Methanosaeta* tiene ventajas cinéticas sobre *Methanosarcina*. No obstante, la abundancia relativa de estos dos microorganismos también está influenciada por la carga de sustrato alimentada a los reactores. *Methanosaeta* es predominante en reactores de alta carga debido a su eficiente adhesión y a su participación en el fenómeno de granulación; mientras que *Methanosarcina* es más sensible al estrés hidráulico y suele predominar en reactores de lecho fijo y de tanque agitado (Liu y Whitman, 2008).

La metanogénesis hidrogenotrófica procede según una serie de cuatro reacciones en la que se reducen dos electrones para convertir el CO_2 o el bicarbonato en CH_4 (Boone et al., 1993). Los electrones proceden fundamentalmente de la oxidación del H_2 o del formiato. Además, algunos metanógenos hidrogenotróficos pueden oxidar alcoholes secundarios y alcohololes primarios para la reducción del CO_2 (Widdel, 1986; Widdel et al., 1988).

La mayoría de los metanógenos pueden reducir el CO₂ a metano utilizando el hidrógeno como donador primario de electrones (Liu y Whitman, 2008). Como se indicó anteriormente, la habilidad de los metanógenos hidrogenotróficos para mantener la presión parcial de hidrógeno en valores bajos afecta los productos de la etapa acidogénica y es esencial para la degradación de los sustratos acetogénicos. Muchos metanógenos también pueden usar el formiato de manera equivalente al hidrógeno como aceptor primario de electrones (Boone et al., 1993). El formiato es un producto común de las reacciones fermentativas y puede ser un intermediario esencial para el metabolismo sintrófico (McInerney, 2001). Ambos mecanismos de transferencia de electrones entre especies, el de hidrógeno y el de formiato, son fundamentales para la degradación de la materia orgánica en reactores metanogénicos (Shen et al., 2016; Stams, 1994).

Algunos metanógenos hidrogenotróficos también pueden utilizar alcoholes secundarios —como el isopropanol— como donadores de electrones para la formación de metano (Widdel, 1986; Zellner y Winter, 1987), y un número reducido puede usar alcoholes primarios como el etanol (Frimmer y Widdel, 1989; Widdel et al., 1988). El uso de este tipo de sustratos es una excepción a la incapacidad generalizada de los metanógenos para metabolizar directamente la mayoría de sustratos. No obstante, la oxidación ocurre de manera incompleta y la formación de metano procede de la reducción del dióxido de carbono (Liu y Whitman, 2008).

Los metanógenos hidrogenotróficos se clasifican en tres órdenes dentro del dominio Arquea: *Methanobacteriales*, *Methanococcales* y *Methanomicrobiales* (Zinder, 1993). Los géneros más comunes en digestores anaerobios corresponden a *Methanobacterium*, *Methanospirillum* y *Methanoculleus* (Leclerc et al., 2004; Liu y Whitman, 2008). Debido a que los metanógenos hidrogenotróficos son autotróficos, su rendimiento de biomasa, en el intervalo de 0.01 a 0.06 DQO_{biomasa} g DQO⁻¹, es más bajo que el de los metanógenos acetoclásticos (0.03 a 0.07 g DQO_{biomasa} g DQO⁻¹). Por ello, la producción de CH₄ no contribuye de manera significativa a la formación de nuevas células (Grady et al., 2011).

La metanogénesis también se efectúa mediante la reducción del grupo metilo de compuestos como el metanol, trimetilamina y dimetil sulfuro (metanogénesis metilotrófica). Los electrones requeridos para la reducción del grupo metilo a metano se obtienen de la oxidación de una fracción de los grupos metilo a dióxido

de carbono, o de la oxidación del hidrógeno (Boone et al., 1993). En la primera ruta, que siguen la mayoría de los metanógenos metilotróficos, tres grupos metilo se reducen a metano por cada molécula de CO₂ formada. Otros metanógenos metilotróficos como *Methanospaera* se especializan en la reducción del grupo metilo mediante la oxidación del hidrógeno (Tabla 1.2) (Miller y Wolin, 1985). Los microorganismos capaces de reducir compuestos metilados para la formación de metano se limitan al orden *Methanosarcinales*, a excepción de las especies de *Methanospaera*, que pertenecen al orden *Methanobacteriales* (Liu y Whitman, 2008).

1.2.2 Factores que inciden en el proceso de degradación anaerobia

La degradación anaerobia de la materia orgánica es un proceso biológico fuertemente influenciado por factores ambientales y operacionales que afectan de manera directa a la actividad metabólica de los microorganismos involucrados. La operación adecuada de los reactores anaerobios y su optimización requieren del conocimiento de dichos factores y de su influencia sobre el proceso. A continuación, se describen los parámetros operacionales y ambientales de mayor incidencia en el funcionamiento de los reactores anaerobios.

Temperatura

Entre los factores que afectan al crecimiento de los microorganismos, la temperatura es uno de los más importantes. La temperatura afecta a la velocidad de reacción y a la velocidad de difusión del sustrato, de modo que es un parámetro transcendental para el diseño y la operación de un sistema de tratamiento biológico. La temperatura influye, además, en otros factores como la solubilidad de gases, la solubilidad de compuestos orgánicos e inorgánicos y en las características de sedimentación de los sólidos biológicos debido a cambios en la viscosidad del agua (Lettinga et al., 2001; Ozgun et al., 2013).

Los sistemas de tratamiento anaerobio se asocian con tres intervalos de temperatura en los que el crecimiento microbiano tiene lugar: psicrófilico, entre 4 y 15 °C; mesófilico, entre 20 y 40 °C; y termófilico, entre 45 y 70 °C (Chernicharo, 2007). Generalmente, la actividad biológica de los microorganismos aumenta con el aumento de la temperatura. No obstante, en cada intervalo existe un valor óptimo

en el cual la velocidad de crecimiento es máxima. A partir de este valor, un leve incremento en la temperatura puede causar un descenso abrupto de la velocidad de crecimiento, tal como se observa en la Figura 1.4, que ilustra la velocidad de crecimiento relativo de los microorganismos metanogénicos en los diferentes intervalos de temperatura. Los procesos anaerobios presentan un mejor rendimiento en los intervalos de temperatura mesofílico y termofílico, en los que el crecimiento óptimo de los microorganismos metanogénicos se encuentra entre 30 y 40 °C, y entre 50 y 60 °C, respectivamente. De modo que la mayoría de los sistemas de tratamiento anaerobio se diseñan en estos intervalos de temperatura (Grady et al., 2011).

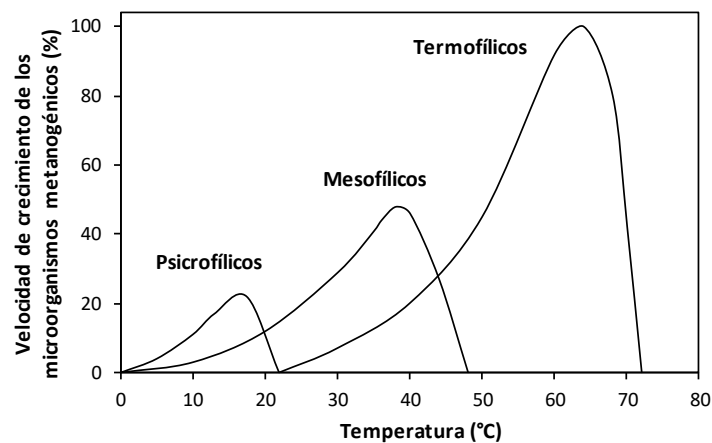


Figura 1.4. Velocidad de crecimiento relativo de los metanógenos psicofílicos, mesofílicos y termofílicos (adaptada de Lettinga, 2001).

Entre las distintas etapas que componen el proceso de degradación anaerobia, la temperatura de operación afecta en mayor medida a la acetogénesis y a la metanogénesis, ya que las bacterias acetogénicas y las arqueas metanogénicas que efectúan ambas etapas, respectivamente, son microorganismos especializados muy sensibles a los cambios de temperatura (Rajeshwari et al., 2000). No obstante, la temperatura de operación también puede afectar las reacciones hidrolíticas-acidogénicas. Para aguas residuales con un contenido de materia orgánica simple o fácilmente biodegradable, la temperatura tiene una mayor influencia sobre la metanogénesis (Grady et al., 2011). En contraste, para aguas residuales con un alto contenido de materia orgánica compleja o material particulado, el efecto de la temperatura en las etapas hidrolítica y acidogénica es más significativo debido a que

las enzimas que catalizan estas reacciones son muy sensibles a las variaciones de temperatura (Rizvi et al., 2014; van Lier et al., 2008).

Como se indicó anteriormente, las aplicaciones a gran escala de procesos anaerobios se efectúan en los intervalos de temperatura mesofílico y termofílico debido a su operación eficaz y al hecho de que hasta hace poco, los procesos psicofílicos no se consideraban viables debido a la baja actividad metabólica de los microorganismos y a las bajas tasas de producción de biogás (Connaughton et al., 2006a). Sin embargo, muchos efluentes procedentes de actividades industriales se descargan a una temperatura ambiente baja (Lettinga et al., 2001), por lo que el estudio y la optimización del tratamiento anaerobio a bajas temperaturas ha suscitado un interés creciente (Collins et al., 2006; Enright et al., 2005; McKeown et al., 2012; Scully et al., 2006; Xing et al., 2009; Zhang et al., 2018). El tratamiento anaerobio de aguas residuales a bajas temperaturas permite reducir el coste económico asociado a la necesidad de aumentar la temperatura del sistema para llevar a cabo el proceso.

En general, los procesos biológicos proceden a menor velocidad en condiciones psicofílicas respecto a las condiciones mesofílicas o termofílicas. La disminución de la temperatura conduce a una disminución de la velocidad máxima de crecimiento de los microorganismos y de la velocidad de utilización del sustrato orgánico, provocando una disminución en la eficacia de eliminación de la materia orgánica. Sin embargo, también puede conducir a un mayor rendimiento neto de biomasa de las poblaciones metanogénicas y acetogénicas (Lettinga et al., 2001) debido a que la velocidad de muerte en condiciones psicofílicas es muy baja (Rajeshwari et al., 2000). La mayoría de las reacciones biológicas que tienen lugar durante la degradación anaerobia de la materia orgánica son menos favorables energéticamente a bajas temperaturas, aunque algunas reacciones, entre ellas la metanogénesis hidrogenotrófica y la acetogénesis hidrogenotrófica, son más favorables a menor temperatura (Lettinga et al., 2001). Varios investigadores han observado que a bajas temperaturas la metanogénesis hidrogenotrófica puede ser la ruta principal para la producción de metano (Collins et al., 2006; Siggins et al., 2011a; Xing et al., 2009).

Por otra parte, puesto que los procesos de conversión de sustrato son más lentos a baja temperatura, el tratamiento psicofílico requiere tiempos de retención largos y, como consecuencia, volúmenes mayores de reacción respecto a los

procesos mesofílicos. No obstante, diversos estudios han demostrado la efectividad de los reactores anaerobios de alta carga para efectuar el tratamiento de efluentes industriales a baja temperatura, aplicando cargas orgánicas superiores a $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, con tiempos de retención bajos, inferiores a 2 días (Connaughton et al., 2006a; Lafita et al., 2015; Siggins et al., 2011b; Xing et al., 2009). Entre otros factores, la factibilidad del tratamiento de efluentes líquidos en condiciones psicofílicas depende de la retención de la biomasa en el sistema y del contacto entre ésta y el agua residual (Lettinga et al., 2001). A este respecto, los reactores anaerobios de alta carga han evidenciado ser una tecnología adecuada para el tratamiento de aguas residuales en condiciones mesofílicas subóptimas —en el intervalo entre 20 y 30 °C (Centurion et al., 2018; Chu et al., 2005; Collins et al., 2006; Lettinga et al., 2001; Vermorel et al., 2017; Yu y Gu, 1996)— y psicofílicas, en virtud de su alta capacidad para retener biomasa activa (Khanal, 2008). A modo de ejemplo, Connaughton et al. (2006a) evaluaron el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria cervecera en reactores híbridos de lecho expandido a 37 y 15 °C. Operando a una carga orgánica próxima a $4.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, la eficacia de eliminación de ambos reactores fue superior al 80 % y el rendimiento de metano fue similar. El desarrollo de comunidades microbianas mesofílicas psicotolerantes, en lugar de comunidades netamente psicofílicas, justificó que el rendimiento de ambos reactores fuese comparable. En una investigación más reciente, Ferrero et al. (2018) llevaron a cabo el tratamiento de una corriente sintética contaminada con disolventes orgánicos de interés en la industria flexográfica (etanol y éteres de glicol) en reactores de alta carga operados a 25 °C, obteniendo eficacias de eliminación superiores al 90 % al aplicar altas cargas orgánicas cercanas a $50 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ lecho d}^{-1}$.

pH y alcalinidad

El pH tiene un impacto significativo en el proceso de degradación anaerobia, ya que la actividad metabólica de los microorganismos decrece cuando el pH del sistema se aleja del intervalo en el cual su crecimiento es óptimo. En particular, el valor y la estabilidad del pH afectan en mayor medida a la metanogénesis, debido a que ésta sólo se lleva a cabo con una velocidad alta cuando el pH es cercano a la neutralidad, mientras que las primeras etapas del proceso pueden ocurrir en un intervalo de pH bastante amplio. Las bacterias acidogénicas presentan una velocidad de crecimiento óptima en el intervalo de pH de 5 a 6, y actividades altas a pH tan bajos como 4.5 (Chernicharo, 2007). En contraste, los microorganismos metanogénicos tienen un pH de crecimiento óptimo en el intervalo de 6.6 a 7.4.

Valores de pH entre 6.3 y 7.8 se consideran adecuados para mantener una alta actividad metanogénica (van Haandel y Lettinga, 1994). El hecho de que los microorganismos metanogénicos sean mucho más sensibles al pH que las bacterias que participan en las otras etapas del proceso de degradación, implica la necesidad de un control estricto de este parámetro para evitar un desequilibrio entre la producción y el consumo de ácidos grasos volátiles, y con ello la acidificación del reactor y la inhibición de la metanogénesis.

El pH de los procesos anaerobios depende, principalmente, de la concentración de ácido carbónico y de la concentración de ácidos grasos volátiles. En el intervalo de pH adecuado de operación (cerca de la neutralidad), la capacidad reguladora del medio depende de la alcalinidad bicarbonática que, en equilibrio con la disociación del ácido carbónico, regula la concentración del ion hidrógeno, tal como se muestra en la siguiente ecuación (Tchobanoglous et al., 2003):

$$\frac{[\text{HCO}_3^-][\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{CO}_3^*]} = K_{a1} \quad (1.10)$$

Siendo K_{a1} , la constante disociación, la cual depende de la fuerza iónica y de la temperatura. El término $[\text{H}_2\text{CO}_3^*]$ representa la concentración de dióxido de carbono y de ácido carbónico en fase acuosa.

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = [\text{CO}_2] + [\text{H}_2\text{CO}_3] \quad (1.11)$$

Puesto que la concentración de ácido carbónico en fase acuosa es relativamente baja, $[\text{H}_2\text{CO}_3^*]$ se aproxima a la concentración de CO_2 disuelto. La fracción de CO_2 en la fase líquida viene determinada por la ley de Henry:

$$x_{\text{CO}_2} = \frac{P_{\text{CO}_2}}{H} \quad (1.12)$$

donde: x_{CO_2} es la fracción molar de CO_2 en el agua, P_{CO_2} es la presión parcial de CO_2 (atm) y H es la constante de Henry (atm).

Así, el requerimiento de alcalinidad puede estimarse de acuerdo con el contenido de CO_2 en el biogás y el pH de operación del sistema.

Bajo condiciones de operación estables, es decir, cuando la producción de ácidos grasos volátiles no excede su consumo, la alcalinidad del medio se mantiene en valores adecuados y el pH puede permanecer estable. No obstante, si los ácidos grasos volátiles se acumulan en el sistema reaccionarán con la alcalinidad, propiciando así el descenso del pH. El control del pH de los procesos anaerobios se establece manteniendo una concentración de alcalinidad suficiente para que el sistema pueda tolerar el incremento en la producción de ácidos grasos volátiles con un descenso mínimo del pH (Grady et al., 2011).

Aporte de nutrientes

Como en todos los procesos biológicos, en los procesos anaerobios la presencia de macronutrientes y micronutrientes es esencial para sustentar la síntesis celular. Los macronutrientes nitrógeno, fósforo y azufre son constituyentes de la biomasa celular; mientras que los micronutrientes —hierro, cobalto, níquel, molibdeno, zinc, selenio y tungsteno— son cofactores esenciales en numerosas reacciones involucradas en la formación de metano (Romero-Güiza et al., 2016; Zandvoort et al., 2006). El requerimiento de nutrientes generalmente se establece a partir de la composición química empírica de las células microbianas y del rendimiento de biomasa, el cual se encuentra entre 0.04 y 0.1 kg SSV kg DQO_{degradada} (Grady et al., 2011). Así, la cantidad que se requiere de los macronutrientes nitrógeno y fósforo para la síntesis de biomasa se puede estimar considerando la fórmula empírica de una célula anaerobia: C₅H₇O₂N (Speece y McCarty, 1964). El nitrógeno equivale aproximadamente a un 12 % de biomasa celular, luego se requieren 12 g por cada 100 g de biomasa anaerobia. En cuanto al fósforo, la demanda de éste representa entre un 15 y un 20 % de la demanda de nitrógeno (Chernicharo, 2007). El requerimiento de macronutrientes también suele estimarse en función de la concentración de materia orgánica del agua residual a tratar. Al respecto, Henze y Harremões (1983) recomiendan una relación DQO:N:P mínima de 400:7:1 para sistemas anaerobios que operan a cargas orgánicas altas (0.8 – 1.2 kg DQO kg SSV⁻¹ d⁻¹), y una relación 1000:7:1 para cargas orgánicas bajas (< 0.5 kg DQO kg SSV⁻¹ d⁻¹). Por su parte, Lettinga et al. (1996) recomiendan una relación DQO:N:P de 1000:5:1 para la degradación de ácidos grasos volátiles con un rendimiento bajo de biomasa anaerobia de 0.05 kg SSV kg DQO⁻¹_{degradada}, y 350:5:1 para la degradación de carbohidratos con una producción de biomasa de 0.15 kg SSV kg DQO⁻¹_{degradada}.

El azufre también es un nutriente necesario para la síntesis celular. Puesto que el contenido de azufre en las células microbianas es bajo, éste se requiere en cantidades relativamente bajas. La concentración óptima de este nutriente para el crecimiento de las poblaciones metanogénicas varía entre 1 y 25 mg S L⁻¹ (Y. Chen et al., 2008).

Respecto a los micronutrientes, el níquel, el cobalto, el molibdeno y el hierro son los de mayor interés debido a su participación en la metanogénesis acetoclástica como cofactores de enzimas como la monóxido de carbono deshidrogenasa, acetil-CoA descarboxilasa, metil-CoM reductasa, entre otras enzimas involucradas en esta ruta metabólica (Romero-Güiza et al., 2016). Otros nutrientes que son necesarios en concentraciones traza para el desarrollo de las poblaciones microbianas son la vitamina B₁₂, el boro, el cobre y el aluminio (Khanal, 2008).

Carga orgánica volumétrica y tiempo de retención hidráulico

La carga orgánica volumétrica es la cantidad de materia orgánica alimentada a un reactor por unidad de tiempo y por unidad de volumen. Este importante parámetro de control describe la cantidad de materia orgánica disponible para el crecimiento de los microorganismos en el sistema de tratamiento (Liu y Tay, 2004), y afecta de manera significativa a la estructura, abundancia y en general, a la dinámica de las comunidades microbianas involucradas en el proceso de degradación (Couras et al., 2014; Ferguson et al., 2016). Una carga orgánica alta implica un crecimiento de la biomasa rápido. Sin embargo, durante la puesta en marcha de reactores anaerobios, una carga orgánica elevada puede resultar en el lavado de la biomasa como consecuencia del aumento en la producción de biogás. En contraste, bajas cargas orgánicas podrían conducir a una deficiencia en el aporte de sustrato y a la disminución en la eficacia del tratamiento.

El tiempo de retención hidráulico (TRH) es el tiempo medio de residencia del agua residual dentro del reactor. Así, para el tratamiento de un caudal determinado de agua residual, el requerimiento del volumen de reacción se reducirá al reducirse el TRH, implicando una inversión menor. En los reactores anaerobios de alta carga la alta concentración de biomasa activa permite la aplicación de altas cargas orgánicas volumétricas con tiempos de retención bajos, que varían entre 4.8 y 48 horas según las características del agua residual a tratar y las características del fango anaerobio (Grady et al., 2011; Nicolella et al., 2000). La aplicación de tiempos

de retención cortos en reactores anaerobios de alta carga propicia la presión selectiva de los microorganismos en virtud del aumento en la velocidad superficial, lo cual promueve el proceso de granulación anaerobia (Alphenaar et al., 1993a), tal como se discutirá de manera más específica en el apartado 2.2.4.

La concentración y el caudal de las aguas residuales procedentes de instalaciones industriales están sujetos a variaciones en las características de los procesos productivos y a las operaciones de lavado. De este modo, en un sistema de tratamiento anaerobio de aguas residuales, las fluctuaciones en ambos parámetros pueden influir de forma adversa en el equilibrio entre las diferentes etapas del proceso de degradación y por tanto, en la eficacia del tratamiento (van Lier et al., 2001). El efecto de las fluctuaciones de la concentración y el caudal depende de la intensidad y duración de las perturbaciones, del tiempo de retención hidráulico aplicado, del tiempo de retención de sólidos, de las propiedades de la biomasa y del diseño del reactor anaerobio (Leitão et al., 2006a). La acumulación de ácidos grasos volátiles y el cambio en la composición de biogás son respuestas típicas a condiciones de estrés inducidas por fluctuaciones en estos dos parámetros (Chua et al., 1997; Kundu et al., 2013; Leitão et al., 2006a; Zealand et al., 2017).

1.3 REACTORES ANAEROBIOS DE ALTA CARGA

En esta sección se describen brevemente las principales características de las tecnologías de tratamiento anaerobio de aguas residuales de mayor uso en la actualidad, haciendo énfasis en los sistemas de alta carga como una tecnología consolidada y que se encuentra ampliamente extendida para el tratamiento de efluentes de origen industrial.

El interés en el tratamiento anaerobio de aguas residuales industriales comenzó a finales de la década de 1960 con el desarrollo de los reactores de alta carga, en los cuales el tiempo de retención de sólidos (TRS) y el TRH están desacoplados (McCarty, 2001). En los reactores de alta carga se obtienen altas concentraciones de biomasa mediante la retención física o la inmovilización del fango anaerobio, permitiendo la aplicación de cargas orgánicas volumétricas altas en tiempos de retención cortos, mientras se mantienen tiempos de retención de sólidos prolongados. Con la introducción de los sistemas de alta carga los volúmenes de reacción requeridos y los costos de capital se redujeron, permitiendo que el

tratamiento anaerobio de aguas residuales industriales fuese considerado práctico y económicamente rentable (van Lier et al., 2015).

En los sistemas de alta carga, el desacoplamiento entre el TRS y el TRH se consigue mediante la aplicación de diversos métodos para la retención de la biomasa, como la inmovilización de los microorganismos en un material de soporte fijo o en movimiento (biopelículas), la formación de agregados fácilmente sedimentables (flóculos o gránulos), o la retención física mediante sedimentación o el uso de membranas. La aplicación de dichos mecanismos ha dado lugar al desarrollo de diferentes configuraciones de reactores de alta carga, como el reactor de contacto anaerobio, el filtro anaerobio, el reactor anaerobio de manto de lodos y flujo ascendente, conocido como UASB por sus siglas en inglés (upflow anaerobic sludge blanket), el reactor de lecho granular expandido o EGSB (expanded granular sludge bed), el reactor de lecho fluidizado, el reactor de circulación interna y los reactores de membrana. En la Figura 1.5 se ilustran varios ejemplos de reactores anaerobios de alta carga.

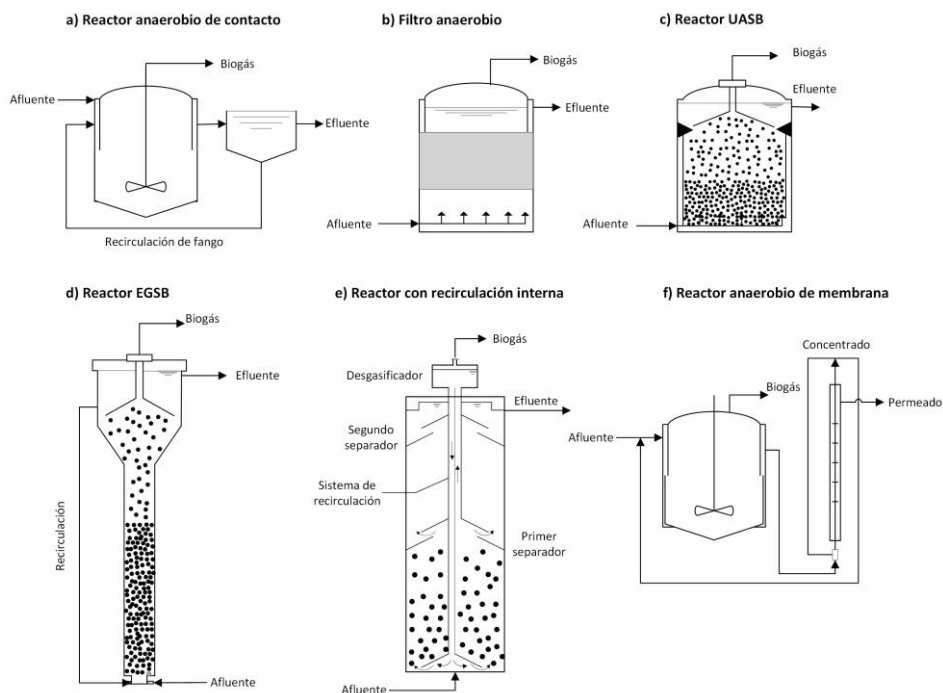


Figura 1.5. Ejemplos de varias configuraciones de reactores anaerobios de alta carga.

De acuerdo con van Lier et al. (2015), cualquier agua residual industrial que contenga contaminantes orgánicos biodegradables puede ser depurada aplicando reactores anaerobios de alta carga, siendo los reactores de lecho granular los sistemas de mayor aplicación (Tay et al., 2010; van Lier, 2008). En estos sistemas, la retención de la biomasa tiene lugar mediante la formación de gránulos o flóculos sedimentables. El reactor UASB, el reactor EGSB, y el reactor de circulación interna son los reactores de lecho granular más implementados para el tratamiento de efluentes industriales. Su aplicación abarca aproximadamente el 90 % de los sistemas de tratamiento anaerobio instalados a escala industrial (van Lier, 2008; van Lier et al., 2015). Sus principales ventajas se encuentran en su capacidad para tratar cargas orgánicas altas en tiempos de retención cortos y aguas residuales de concentración media y baja, en su compactibilidad y facilidad de operación, su resistencia a perturbaciones, el buen contacto entre la biomasa y los contaminantes orgánicos, y la alta actividad metabólica del fango granular. Todo ello deriva en altas eficacias de eliminación y en la obtención de efluentes de elevada calidad (Hulshoff Pol et al., 2004; Lim y Kim, 2014; van Lier et al., 2008). Puesto que en el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se aplican reactores de lecho granular, a continuación, se describen sus principales características.

1.3.1 Reactor UASB

El reactor UASB es la tecnología anaerobia de alta carga más exitosa y de mayor aplicación para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales (Henze et al., 2017). Su éxito puede atribuirse a la capacidad de retener altas concentraciones de fango en tanto se efectúa una separación de las fases sólida, líquida y gaseosa de manera eficiente. La retención de la biomasa se fundamenta en la formación de agregados sedimentables y en la aplicación de un dispositivo interno de forma cónica que permite realizar la separación gas-líquido-sólido (GLS). El sistema consiste en un tanque circular o rectangular en el que el agua residual fluye en dirección ascendente a través de un lecho de fango anaerobio, formado por gránulos o flóculos altamente sedimentables, en el cual tiene lugar la degradación de la materia orgánica. El biogás producido que asciende con el líquido mantiene los gránulos en suspensión generando un manto entre el lecho y la base del separador GLS. Las partículas sólidas retornan al manto de lodos y el biogás liberado se recolecta en la parte superior del reactor; el líquido continúa en ascenso hacia una

zona de sedimentación en la cual se separan los sólidos residuales que retornan al lecho mientras el efluente abandona el sistema. Los reactores UASB se diseñan para el tratamiento de cargas orgánicas volumétricas en el intervalo de 4 a 15 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (Rittmann y McCarty, 2001), con velocidades superficiales entre 0.5 y 1.0 m h⁻¹ (Lim y Kim, 2014).

El rendimiento de los reactores UASB depende de la calidad del fango granular, de modo que la obtención de gránulos con buenas características constituye uno de los desafíos para la aplicación eficaz de esta tecnología en el tratamiento de un sustrato determinado. Uno de los inconvenientes más notables para la aplicación de esta tecnología es el prolongado tiempo para la puesta en marcha, el cual requiere generalmente de 2 a 8 meses para la consecución de gránulos con buenas características fisicoquímicas (Liu et al., 2003; Mao et al., 2015): alta actividad metanogénica, alta velocidad de sedimentación y resistencia estructural a las fuerzas de cizalladura del sistema. La formación y características de los gránulos dependen del tipo de sustrato orgánico presente en el agua residual. Así, las aguas residuales ricas en carbohidratos propician la formación de biomasa granular con facilidad (Hulshoff Pol, 1989; Zhou et al., 2006). La formación de gránulos con aguas residuales compuestas por otros tipos de sustratos como los disolventes orgánicos o los ácidos grasos volátiles procede de manera más lenta (Fukuzaki et al., 1991; Henry et al., 1996; Zhou et al., 2006). Las aguas residuales de industrias lácteas o con un alto contenido en grasas son menos propensas a la formación de gránulos (Uyanik et al., 2002). Otro aspecto importante es el que concierne a la estabilidad de los gránulos. En diversas investigaciones se ha observado que la exposición de un fango granular a un cambio de sustrato orgánico puede conducir al cambio en sus características fisicoquímicas y microbiológicas, y consecuentemente, a la alteración de la eficacia del tratamiento (Kovacik et al., 2010; Lu et al., 2015a; Mao et al., 2015; Yang y Anderson, 1994). Por ejemplo, en el tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen disolventes orgánicos, se ha observado la desintegración de los gránulos tras su exposición a disolventes específicos, después de un periodo prolongado de operación o tras la aplicación de altas cargas orgánicas (Costa et al., 2009; Lafita et al., 2015; Lu et al., 2015a; Vermorel et al., 2017).

1.3.2 Reactor EGSB

El reactor EGSB es una modificación del reactor UASB desarrollada con el propósito de mejorar el contacto entre el fango anaerobio y el agua residual, ya que cuando la velocidad de producción de biogás es baja y la mezcla derivada de la velocidad de flujo ascensional es insuficiente, la operación del reactor UASB no es eficaz. Los sistemas EGSB se diseñan con una relación altura/diámetro alta alrededor de 20 o superior, y se aplican velocidades ascensionales de entre 5 y 10 m h^{-1} (Chernicharo, 2007). La elevada velocidad superficial del líquido y el flujo del biogás producido permiten que el lecho granular se expanda mejorando el contacto entre los gránulos y el agua residual, disminuyendo la presencia de zonas muertas. Este mejor contacto posibilita la aplicación de cargas orgánicas volumétricas superiores a 30 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$ (Lim y Kim, 2014) y el tratamiento de aguas residuales difíciles de depurar en reactores UASB convencionales, como aquéllas que contienen compuestos tóxicos aunque biodegradables bajo condiciones anaerobias (Puyol et al., 2009; Zoutberg y De Been, 1997), aguas residuales a baja temperatura (Lettinga et al., 2001; Scully et al., 2006; Tsushima et al., 2010) y aguas residuales con una baja concentración de sustrato (Kato et al., 1994).

1.3.3 Reactor de circulación interna

El reactor anaerobio de circulación interna es también una modificación del reactor UASB desarrollada con el propósito de garantizar una operación eficiente al aplicar cargas orgánicas altas, entre 30 y 40 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$. Para la aplicación de cargas orgánicas elevadas se precisa una separación GLS más eficiente, ya que la turbulencia causada por el biogás dificulta la retención de la biomasa en los sistemas UASB convencionales (Chernicharo, 2007). Esta configuración consiste en efecto, en dos compartimentos UASB ubicados uno sobre otro e interconectados. En el primer compartimento tiene lugar la mayor parte de la conversión de la materia orgánica a metano y dióxido de carbono. Este biogás se recoge en el primer separador GLS y se utiliza para arrastrar el gas, el agua y el fango granular (por efecto de la elevación del biogás) por una conducción vertical hacia una unidad de desgasificación ubicada en la parte superior del sistema. En esta unidad, el biogás se elimina mientras que el agua y los sólidos descienden al compartimento inferior por otra conducción, lo cual resulta en un flujo de circulación interna (Figura 1.5). En el segundo compartimento se realiza la conversión de la materia orgánica remanente y la

retención adicional de la biomasa mediante el segundo separador GLS. La velocidad ascensional en el compartimento inferior varía entre 10 y 20 m h⁻¹, mientras que en el superior puede variar entre 2 y 10 m h⁻¹ (Nicolella et al., 2000). En el fondo del reactor se produce una mezcla efectiva entre el afluente, la biomasa anaerobia y el efluente del sistema de recirculación que favorece la aplicación de esta configuración para el tratamiento de aguas residuales altamente concentradas (Chernicharo, 2007). Esta tecnología se ha aplicado con éxito en el tratamiento de aguas residuales de industrias cerveceras y de producción de bebidas, industrias de producción de papel, destilerías, industrias de fermentación, y en las industrias química y petroquímica (Mao et al., 2015; Mutombo, 2004).

1.3.4 Reactor híbrido

El reactor híbrido de flujo ascendente combina los aspectos técnicos y las ventajas del reactor UASB y del filtro anaerobio. La sección inferior del reactor está diseñada como un sistema UASB que contiene un lecho de fango granular —o en suspensión (Grady et al., 2011)—, mientras que en la sección superior, en lugar del dispositivo de separación GLS, se encuentra un lecho empacado que permite la retención de la biomasa y proporciona una superficie para la adhesión de los microorganismos. En algunos diseños híbridos el lecho empacado se ubica en la zona de sedimentación del reactor UASB con el dispositivo GLS en la parte superior de éste. En los reactores híbridos se minimizan los problemas de canalización del lecho de los filtros anaerobios y se obtienen efluentes con concentraciones muy bajas de sólidos debido a que las partículas que no sedimentan hacia el manto de lodos se retienen en los intersticios del lecho. La conversión de la materia orgánica se efectúa fundamentalmente en la zona correspondiente al reactor UASB. Las cargas orgánicas aplicadas son similares a las de los sistemas UASB convencionales; no obstante, el reactor híbrido presenta ventajas en cuanto a estabilidad y resistencia a perturbaciones (McHugh et al., 2003b). Así mismo, se ha reportado una mayor eficacia de eliminación de contaminantes específicos presentes en aguas residuales de industrias químicas, por ejemplo, aguas residuales procedentes de la producción de ácido tereftálico (Kleerebezem et al., 1999). También se encuentran referencias de reactores EGSB combinados con filtros anaerobios para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con etanol y ácidos grasos volátiles (Connaughton et al., 2006b), o con mezclas de disolventes orgánicos como etanol, metanol, acetona o propanol en condiciones psicrófilas (Connaughton et al., 2006b; Enright et al., 2005).

1.4 TRATAMIENTO DE DISOLVENTES ORGÁNICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL EN REACTORES ANAEROBIOS DE ALTA CARGA

El interés en el tratamiento biológico de aguas residuales procedentes de actividades industriales se fundamenta en la preocupación ambiental por el incremento de la contaminación de los recursos hídricos, y en sus implicaciones subyacentes en el detrimento de la salud humana y de los ecosistemas en general. Los sectores que emplean disolventes orgánicos en sus procesos productivos no son ajenos a esta preocupación, existiendo un interés creciente por la aplicación de tecnologías sostenibles que permitan efectuar el tratamiento de estos contaminantes a bajo coste y con altas eficacias de eliminación. Tal como ha quedado descrito en la sección anterior, los reactores anaerobios de lecho granular tienen un potencial significativo para la recuperación de energía en forma de metano a partir del tratamiento de aguas residuales de mediana y alta concentración de contaminantes de origen industrial. La mayoría de las aplicaciones de los reactores de lecho granular se encuentran en la industria alimentaria y de procesos agroindustriales; sin embargo, su aplicación en otros sectores está en crecimiento (van Lier et al., 2015). Entre estos sectores se pueden mencionar la industria de fabricación de papel (Capela et al., 2009), la industria química y petroquímica (Razo-Flores et al., 2006), destilerías (Akarsubasi et al., 2006) y la industria farmacéutica (Aydin et al., 2015; Svojitka et al., 2017).

Con el desarrollo del concepto del biolavador anaerobio se ha demostrado la aplicación de este sistema para el tratamiento de las emisiones atmosféricas de la industria flexográfica (Bravo, 2017; Waalkens et al., 2015). Dichas emisiones se caracterizan por la presencia de disolventes orgánicos oxigenados de alta solubilidad en agua. Bravo et al. (2017) reportaron que los principales disolventes orgánicos que componen las emisiones de una industria flexográfica son: etanol (60-65 %), acetato de etilo (20-25 %) y 1-etoxi-2-propanol (10-15 %); mientras que otros disolventes como isopropanol (0.5-1 %), acetato de isopropilo (0-0.5 %), acetato de propilo (0-3 %), alcohol de diacetona (0.2-5 %) y 1-propanol (0-2 %), se encuentran en bajas proporciones. La transferencia de estos disolventes a una fase líquida mediante una torre de absorción permite su posterior degradación anaerobia. En diferentes estudios se ha demostrado la efectividad de los reactores anaerobios de alta carga, en particular, de los reactores de lecho granular, para efectuar el tratamiento de disolventes orgánicos. En la Tabla 1.3. se presenta una revisión bibliográfica acerca de la aplicación de reactores de lecho granular para el tratamiento

Tabla 1.3. Reactores de lecho granular aplicados al tratamiento de los disolventes orgánicos de interés: etanol, acetato de etilo y E2P.

Tipo de agua residual	Configuración de reactor	Disolvente orgánico	CO ¹ (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	TRH (H)	T (°C)	pH	EE (%)	Referencia
Cervecería	UASB (1830 m ³)	Etanol	7-15	6.7	-	6.8-7.5	>70	Ahn et al. (2001)
Cervecería	UASB (1.17 m ³)	Etanol	4.9	13.3	26.1	7	89	Herbert et al. (1990)
Cervecería	UASB (12.2 L)	Etanol	12.2	4	21.8 ± 1.5	7.1 ± 0.8	89	Yan y Tay (1996)
Cervecería	EGSB híbrido (3.38 L)	Etanol	4	18	15	7.2 ± 0.4	88 ± 7.2	Connaughton (2006a)
Cervecería	UASB (16 L)	Etanol	2.91 ± 0.9	12	19-24	7.0 ± 0.2	85 ± 6	Cronin y Lo (1998)
Cervecería	IC (10 L)	Etanol	19.5	2.5	35 ± 0.1	7.1 ± 0.2	80	Xu et al. (2013)
Sintética-cervecería	UASB (7 L)	Etanol/AGV ²	12	11.2	35	6.6-6.8	>97	Kovacik et al. (2010)
Sintética-cervecería	EGSB (15 L)	Etanol	9.7	18	20	6.8-7.2	>85	Xing et al. (2009)
Sintética	UASB (0.6 L)	Etanol	36.5	4.3	37	6.5-7.0	88	Fukuzaki et al. (1995)
Sintética	EGSB (2.5 L)	Etanol	6.4	0.5	30 ± 0.2	6.5-7.0	89	Kato et al. (1994)

Tabla 1.3. (Continuación). Reactores de lecho granular aplicados al tratamiento de los disolventes orgánicos de interés: etanol, acetato de etilo y E2P.

Tipo de agua residual	Configuración de reactor	Disolvente orgánico	CO ¹ (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	TRH (H)	T (°C)	pH	EE (%)	Referencia
Producción de H ₂	UASB (40 L)	Etanol	12.9	5.8	37 ± 1	6.7	96	Han et al. (2005)
Sintética-industria farmacéutica	EGSB híbrido (4 L)	Etanol, acetato y metanol	5-20	24-6	15	-	60-70	Enright et al. (2005)
Destilería	UASB (476 m ³)	Etanol	2.5-8.5	-	35-37	~7	60-80	Ince et al. (2005)
Destilería	UASB (24 L)	Etanol	11.6	96	37	7.3-8.0	96	Petta et al. (2017)
Sintética-disolventes orgánicos	EGSB (4 L)	Acetato de etilo ³	45.3*	9.6	25	7.1-7.3	>97	Lafita (2016)
Sintética-industria Farmacéutica	UASB híbrido (16.3 L)	Acetato de etilo ⁴	4.5	48	35 ± 2	8	>97	Henry et al (1996)
Industria Farmacéutica	UASB híbrido (14 L)	Acetato de etilo/mezcla	6	24	--	6.8-7.2	75	Oktem et al. (2007)
Industria Flexográfica	EGSB (8.7 m ³)	Etanol, acetato de etilo y E2P	24*	3	25.1 ± 3.2	7.4 ± 0.3	93 ± 5	Bravo et al. (2017)
Sintética-disolventes orgánicos	EGSB (4 L)	Etanol y E2P	54*	9.6	25	7.0-8.2	>92	Ferrero et al. (2018)

¹CO: carga orgánica total; ²AGV: ácidos grasos volátiles; ³Mezcla de acetato de etilo, etanol, 1-metoxi-2-propanol, isopropanol y acetona; ⁴Mezcla de acetato de etilo, etanol, metanol y AGV; ⁵CO: kg DQO m⁻³lecho d⁻¹

de los disolventes orgánicos de mayor importancia en las emisiones de la industria flexográfica, y que son de interés en el desarrollo de esta tesis doctoral. En los siguientes apartados se detallan los principales aspectos bioquímicos y microbiológicos de la degradación anaerobia de estos disolventes orgánicos.

1.4.1 Degradación anaerobia de etanol

El etanol es un sustrato fácilmente biodegradable en condiciones anaerobias (Bitton et al., 2016). La degradación anaerobia de etanol se puede producir por varias vías, en la Tabla 1.4 se presentan las reacciones involucradas en la degradación anaerobia de etanol.

En ambientes metanogénicos, la degradación del etanol se produce mediante la interacción sintrófica entre bacterias acetogénicas y arqueas metanogénicas. De hecho, la degradación metanogénica de etanol fue el primer caso de estudio de una interacción sintrófica entre microorganismos. Bryant et al. (1967) estudiaron la degradación de etanol en miembros del cultivo *Methanobacillus omelianskii*. Estos autores demostraron que *Methanobacillus omelianskii* no correspondía a una especie, sino a un cultivo sintrófico de dos microorganismos: el organismo S y la cepa metanogénica M.O.H de *Methanobacterium bryantii*. El organismo S realizaba la oxidación del etanol a acetato e hidrógeno (Ecuación 1.13), mientras que el microorganismo metanogénico utilizaba el hidrógeno producido para reducir el dióxido de carbono a metano (Ecuación 1.14). La interacción sintrófica entre ambos microorganismos permite que la formación de metano a partir de etanol sea termodinámicamente favorable en condiciones estándar (Ecuación 1.16). Desde entonces, se han descrito otros microorganismos capaces de acoplar la oxidación de etanol a la producción de metano, incluyendo especies del género *Pelobacter* (Eichler y Schink, 1985; Schink, 2006, 1984), que son predominantes en fangos anaerobios en los que la oxidación sintrófica de etanol tiene lugar (Bravo et al., 2017; McInerney et al., 2008), homoacetógenos (Plugge et al., 1990) y especies del género *Desulfovibrio* (Bryant et al., 1977; Thiele y Zeikus, 1988; Xing et al., 2017).

Tabla 1.4. Reacciones acetogénicas, metanogénicas, sulfurogénicas y fermentativas involucradas en la degradación anaerobia del etanol (adaptado de Thauer et al. (1977), Schink et al. (1987) y Liamleam y Annachatre (2007)).

Reacciones	ΔG° (kJ reacción ⁻¹)	
Acetogénicas		
$C_2H_5OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+9.6	(1.13)
Metanogénicas		
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135.6	(1.14)
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31.0	(1.15)
$2CH_3CH_2OH + HCO_3^- \rightarrow 2CH_3COO^- + H_2O + CH_4 + H^+$	-116.4	(1.16)
Sulfurogénicas		
$2C_2H_5OH + SO_4^{2-} \rightarrow 2CH_3COO^- + HS^- + H^+ + 2H_2O$	-132.7	(1.17)
$CH_3COO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2HCO_3^- + HS^-$	-47.6	(1.18)
$SO_4^{2-} + H^+ + 4H_2 \rightarrow HS^- + 4H_2O$	-151.9	(1.19)
Fermentativas		
$3C_2H_5OH + 2HCO_3^- \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + CH_3COO^- + H^+ + 3H_2O$	-124.5	(1.20)
$C_2H_5OH + CH_3COO^- \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + H_2O$	-38.6	(1.21)

Por otra parte, en condiciones anaerobias, las bacterias sulfatoreductoras utilizan el sulfato como aceptor de electrones para la degradación de compuestos orgánicos y la producción de ácido sulfhídrico y energía (Ecuaciones 1.17-1.19). En presencia de sulfato, estos microorganismos compiten con las bacterias fermentativas, las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno y los microorganismos metanogénicos por el sustrato disponible en el medio (Alphenaar et al., 1993b; Hao et al., 2014; Muyzer y Stams, 2008). Se ha observado que los principales microorganismos productores de acetato a partir de la oxidación de etanol y la reducción de sulfato en reactores UASB son especies del género

Desulfovibrio (Hu et al., 2015; Jing et al., 2013), microorganismos que además, pueden llevar a cabo la deshidrogenación acetogénica del etanol en sintrofia con arqueas metanogénicas cuando la concentración de sulfato del medio es baja (Bryant et al., 1977). Puesto que los microorganismos sulfatoreductores dependen de la presencia de sulfato para llevar a cabo la oxidación de la materia orgánica, la competencia entre éstos y los microorganismos involucrados en la degradación de los sustratos hasta metano incrementa a medida que la relación DQO/SO_4^{2-} del agua residual disminuye. Así, resulta interesante el trabajo de Hu et al. (2015), quienes evaluaron el efecto de la relación DQO/SO_4^{2-} en el tratamiento anaerobio de un agua residual sintética contaminada con etanol, acetato y sulfato en un reactor UASB. Estos autores encontraron que para una relación DQO/SO_4^{2-} alta con un valor de 20 ($150 \text{ mg } SO_4^{2-} \text{ L}^{-1}$) y baja con un valor de 0.5 ($6000 \text{ mg } SO_4^{2-} \text{ L}^{-1}$), los microorganismos oxidaron la mayoría de la materia orgánica para la producción de metano, siendo la metanogénesis acetoclástica la ruta predominante para la relación DQO/SO_4^{2-} alta, mientras que con la relación DQO/SO_4^{2-} baja, tanto la metanogénesis acetoclástica como la hidrogenotrófica contribuyeron a la formación de metano. En ambos casos, las bacterias sulfato reductoras utilizaron el etanol y el hidrógeno disponibles, pero no el acetato, siendo por tanto la metanogénesis la ruta principal para la oxidación de la materia orgánica. No obstante, la conversión del sustrato a metano disminuyó desde un valor del 80.5 hasta el 54.4 % cuando la relación DQO/SO_4^{2-} se redujo de 20 a 0.5. A partir de la evaluación microbiológica del fango del reactor UASB, los autores determinaron que las bacterias sulfato reductoras del género *Desulfovibrio* sólo desempeñaron un papel importante en la degradación del etanol cuando la relación DQO/SO_4^{2-} fue de 0.5. Además, todas las especies sulfatoreductoras que se encontraron en el fango fueron identificadas como microorganismos incapaces de llevar a cabo la oxidación completa del sustrato orgánico hasta CO_2 , convirtiendo el etanol a acetato, el cual posteriormente fue utilizado por los metanógenos acetoclásticos. Las bacterias del género *Geobacter* fueron importantes para la degradación del sustrato operando a una relación de 20, es decir, con concentraciones bajas de sulfato.

La degradación anaerobia del etanol también procede mediante reacciones fermentativas (Stams, 1994) (Ecuaciones 1.20 y 1.21). Este compuesto puede fermentarse a acetato y a propionato por la acción de microorganismos como *Pelobacter propionicus* y *Desulfohalobium propionicus* (Schink et al., 1987), y a butirato por *Clostridium kluyveri* (Stams y Plugge, 2009). Las bacterias fermentativas generalmente tienen velocidades de crecimiento específicas más altas que las de los

microorganismos acetogénicos que realizan la degradación sintrófica. No obstante, en fangos granulares, estos últimos son muy abundantes, de modo que pueden competir con los microorganismos fermentativos a bajas concentraciones de sustrato (Stams, 1994).

En la Tabla 1.3 se muestran algunas configuraciones de reactores de alta carga aplicados al tratamiento de afluentes contaminados con etanol, junto con las condiciones operacionales: carga orgánica, TRH, temperatura, pH y eficacia de eliminación de la materia orgánica. Como se puede observar en dicha tabla, los reactores de alta carga se han aplicado para la depuración de aguas residuales industriales contaminadas con etanol, como las aguas residuales de la industria cervecera, de destilerías y de la producción de biocombustibles (bioetanol). Los reactores UASB y EGSB se han aplicado al tratamiento de aguas residuales sintéticas contaminadas con altas y bajas concentraciones de etanol, operando a altas cargas orgánicas. Se puede destacar el estudio llevado a cabo por Enright et al. (2005), quienes evaluaron el tratamiento de un agua residual sintética de la industria farmacéutica contaminada con etanol, ácido acético y metanol en una relación 1:1:1 (en función de la DQO) en reactores EGSB híbridos operados bajo condiciones psicrófilas, con cargas orgánicas en el intervalo comprendido entre 5 y 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Durante 450 días de operación, los reactores alcanzaron eficacias de eliminación en el intervalo entre el 60 y el 70 %. En el tratamiento de un afluente sintético que contenía etanol como único sustrato orgánico en una concentración de 6500 mg DQO L⁻¹, Fukuzaki et al. (1995) obtuvieron eficacias de eliminación superiores al 85 % operando un reactor UASB con una carga orgánica de hasta 37.5 kg DQO m⁻³ d⁻¹ a una temperatura de 37 °C. Más recientemente, Lafita et al. (2015) evaluaron la viabilidad del tratamiento anaerobio de aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos procedentes de la industria flexográfica. Estos autores operaron dos reactores EGSB a temperaturas de 18 y 25 °C para el tratamiento de un agua residual sintética contaminada con etanol y 1-metoxi-2-propanol (M2P) en una relación másica de 4:1, alcanzando eficacias de eliminación superiores al 95 % al aplicar cargas orgánicas entre 29 y 43 kg DQO m⁻³lecho d⁻¹ a 18 y 25 °C, respectivamente. Por su parte, en la prueba de concepto del biolavador anaerobio para la depuración de emisiones de COV procedentes de una industria flexográfica, con etanol como el compuesto principal (60-65 % de la emisión), Bravo et al. (2017) obtuvieron eficacias de eliminación de la materia orgánica del 93 ± 5 % operando un reactor EGSB a temperaturas de 25.1 ± 3.2 °C con una carga orgánica promedio de 24 kg DQO m⁻³lecho d⁻¹.

1.4.2 Degradación anaerobia de acetato de etilo

El acetato de etilo ha sido descrito como un disolvente orgánico fácilmente biodegradable en condiciones anaerobias (Lafita, 2016; Vermorel, 2017; Yanti et al., 2014). Si bien el mecanismo de degradación de los ésteres etílicos no ha sido dilucidado, Yanti et al. (2014) sugirieron que la ruta de conversión podría ser la misma que sigue la degradación de los ésteres metílicos: la formación de un ácido carboxílico y un alcohol por parte de bacterias como *Acetobacterium woodii* y *Eubacterium limosum* (Liu y Suflita, 1994). Así pues, el acetato de etilo podría ser transformado en etanol y ácido acético, productos que posteriormente serán convertidos en metano siguiendo las rutas anteriormente descritas.

En cuanto a la aplicación de reactores de alta carga para la depuración de efluentes contaminados con acetato de etilo, Henry et al. (1996) reportaron la eliminación completa de este disolvente orgánico en reactores UASB híbridos operando con un tiempo de retención de 2 días y una concentración en el afluente de 500 mg L⁻¹. Lafita (2016) estudió la degradación anaerobia de un agua residual sintética contaminada con acetato de etilo y otros disolventes orgánicos de uso habitual en la formulación de tintas (etanol, 1-metoxi-2-propanol, isopropanol y acetona). Este autor obtuvo eficacias de eliminación superiores al 97 % y rendimientos de metano entre 0.30 y 0.36 Nm³ CH₄ kg DQO_{degradada}⁻¹, aplicando cargas orgánicas de acetato de etilo entre 5.5 y 40.3 kg DQO m⁻³lecho d⁻¹ con concentraciones en el afluente de 3 a 10 g DQO L⁻¹.

1.4.3 Degradación anaerobia de 1-etoxi-2-propanol

El estudio de la degradación anaerobia de éteres de glicol como el 2-fentoxietanol y el polietilenglicol (PEG) ha sugerido que la escisión del enlace éter tiene lugar mediante la acción la enzima diol deshidratasa o de enzimas que actúan de manera análoga (Schramm y Schink, 1991; Speranza et al., 2002). Las enzimas que catalizan la escisión del enlace éter se han encontrado en el citoplasma de microorganismos como *Acetobacterium* sp. y *Pelobacter venetianus*. El mecanismo de reacción comúnmente aceptado para la escisión del enlace éter de glicol implica una transhidroxilación (doble intercambio H-OH) para formar un diol geminal que colapsa rápidamente a un grupo carbonilo o cetona (Speranza et al., 2002; White et al., 1996).

Lafita et al. (2015) propuso que los productos esperados de la degradación anaerobia del éter de glicol 1-metoxi-2-propanol serían la acetona o el propionaldehído y el metanol. A partir del mecanismo para la escisión del enlace éter de glicol y de la observación de la composición del efluente de reactores EGSB que trataban etanol, 1-metoxi-2-propanol y 1-etoxi-2-propanol, Ferrero et al. (2018) propusieron un mecanismo para la ruptura del enlace éter de este último compuesto, en el cual se obtienen como productos etanol y acetona (Figura 1.6). En los experimentos conducidos por Ferrero et al. (2018) se aplicó una carga orgánica de 1-etoxi-2-propanol de hasta $10.6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ lecho d}^{-1}$, alcanzando una eficacia de eliminación del 70 %. Estos autores, además, detectaron isopropanol en el efluente de los reactores, compuesto que podría resultar de la reacción reversible de la acetona con hidrógeno (Tonouchi, 2004; Zellner y Winter, 1987). Siguiendo la ruta de degradación anaerobia, posterior a la formación de los productos intermediarios etanol y acetona, éstos se degradan hasta convertirse en metano y dióxido de carbono. La degradación del etanol tiene lugar de acuerdo con las reacciones que se muestran en la Tabla 1.4. En cuanto a la acetona, Platen y Schink (1987) observaron que en cultivos enriquecidos con microorganismos metanogénicos, la degradación anaerobia de este compuesto ocurría mediante la interacción sintrófica entre bacterias fermentativas y metanógenos acetotróficos. Las bacterias fermentativas realizaban la carboxilación de la acetona para formar acetato, el cual posteriormente se transfería a *Methanosaeta* sp. para la formación de metano y CO_2 . Estos autores señalaron que la degradación eficaz de la acetona requiere del consumo eficiente del acetato por parte de los metanógenos.

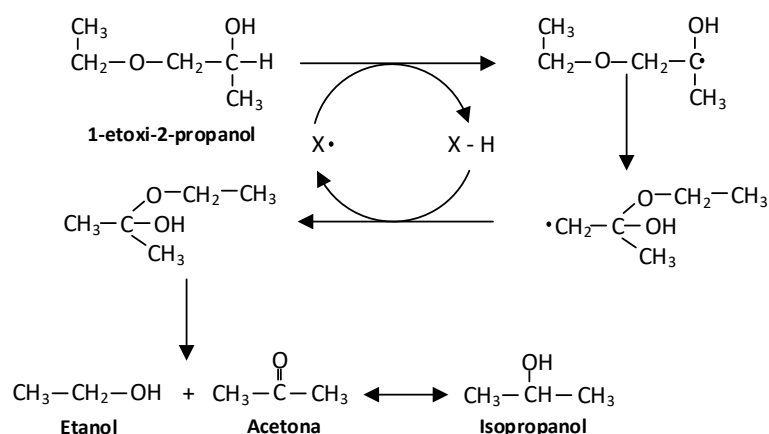


Figura 1.6. Mecanismo de degradación anaerobia del 1-etoxi-2-propanol (Ferrero et al. 2018).

2 PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOMASA GRANULAR

El desarrollo y el éxito de los sistemas de tratamiento de lecho granular se puede atribuir al proceso de granulación anaerobia (Hulshoff Pol et al., 2004; van Lier, 2008). La formación de gránulos confiere al fango anaerobio una velocidad de sedimentación lo suficientemente alta para alcanzar una alta concentración de biomasa en el sistema, lo cual permite la degradación rápida de la materia orgánica, la aplicación de altas cargas y el uso de reactores compactos (Liu et al., 2003). Junto con la formación de gránulos, se considera de igual importancia el mantenimiento de su estabilidad estructural a largo plazo, de manera que se garantice la retención del fango y la eliminación eficaz de los contaminantes, mientras se aplican altas cargas orgánicas, o mientras el proceso de tratamiento se somete a variaciones en los parámetros de operación, como caudal, concentración, composición, pH o temperatura (Bhunia y Ghangrekar, 2007; Kovacik et al., 2010; O'Flaherty et al., 1997).

Como se mencionó en el capítulo anterior, los reactores anaerobios de lecho granular se han aplicado al tratamiento de aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos oxigenados de interés industrial. No obstante, en diversas investigaciones se ha reportado un inconveniente importante: la pérdida de la estabilidad estructural de los gránulos y su desintegración parcial o total. Dicho inconveniente afecta a la retención de la biomasa, a la producción de metano, a la posibilidad de la aplicación de altas cargas orgánicas y, en general, a la eficacia del tratamiento (Costa et al., 2009; Henry et al., 1996; Lafita et al., 2015; Lu et al., 2015a; Vermorel et al., 2017). Por todo ello, para la aplicación efectiva de reactores de lecho granular al tratamiento de disolventes orgánicos es necesario conocer los mecanismos y factores que dan lugar a la formación de gránulos, así como las condiciones que pueden propiciar la desintegración de los agregados. En este capítulo se presentan las teorías y mecanismos principales que se han desarrollado para explicar el proceso de granulación anaerobia y los factores que influyen en dicho proceso. Asimismo, se presentan algunas experiencias recogidas en la bibliográfica respecto a la formación de biomasa granular en reactores anaerobios alimentados con disolventes orgánicos.

2.1 TEORÍAS Y MECANISMOS DE GRANULACIÓN ANAEROBIA

La granulación anaerobia es un proceso natural en el que los microorganismos se compactan en una estructura esférica o elipsoidal formando un ecosistema o

consorcio microbiano con una arquitectura interna característica. Los gránulos anaerobios se caracterizan 1) por su alta actividad metanogénica específica, presentando valores típicos entre 0.3 y 1.2 g DQO-CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ (Bhunia y Ghangrekar, 2007), aunque se han reportado fangos con actividades mayores a 2.0 g DQO-CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ (Show et al., 2004); 2) por su alta velocidad de sedimentación, que se encuentra en el intervalo comprendido entre 15 y 50 m h⁻¹; y 3) por su tamaño, con valores típicos entre 0.15 y 4.0 mm (van Lier et al., 2008). La presencia de estos consorcios se considera un requisito previo para la operación adecuada de los reactores anaerobios de lecho granular (van Lier et al., 2015). Considerando que la degradación de la materia orgánica en ambientes metanogénicos requiere la interacción sintrófica de diferentes grupos de microorganismos (Stams y Plugge, 2009), la formación de agregados reduce la distancia entre las comunidades microbianas favoreciendo el transporte de metabolitos, lo cual resulta en altas velocidades de degradación (Kundu et al., 2014; Stams et al., 2012). El desarrollo de gránulos también provee una mayor resistencia al efecto perjudicial de concentraciones altas de compuestos intermediarios, a la variación de factores ambientales como el pH, la temperatura y el potencial redox, y a la presencia de compuestos tóxicos o inhibidores en el agua residual, como metales pesados, compuestos xenobióticos u oxígeno (Solera del Río, 2014). El estudio de los factores que determinan la formación y el mantenimiento de la biomasa granular ha propiciado el desarrollo de los sistemas anaerobios de lecho granular y su aplicación eficaz en el tratamiento de diversos tipos de aguas residuales de origen industrial, como ha quedado expuesto en el capítulo anterior.

En general, el proceso de granulación anaerobia tiene lugar en sistemas de tratamiento de sustratos solubles que operan con flujo de alimentación ascendente y con tiempos de retención hidráulicos más bajos que los tiempos de duplicación de los microorganismos anaerobios (van Lier et al., 2015). Los mecanismos y factores involucrados en la formación de gránulos se han estudiado, en mayor medida, en reactores de tipo UASB (Hulshoff Pol et al., 2004; Liu et al., 2003), ya que generalmente los reactores EGSB y de circulación interna operan a velocidades superficiales demasiado altas para ser inoculados con biomasa no granular. Se han desarrollado diferentes teorías a fin de elucidar los principales mecanismos involucrados en el proceso de granulación anaerobia y poder así ejercer un control sobre los factores que dan lugar a este fenómeno. Estas teorías se pueden clasificar, atendiendo al mecanismo que da lugar a la formación de los gránulos, en teorías fisicoquímicas, en teorías estructurales y ecológicas y en teorías termodinámicas. No

obstante, la formación de biomasa granular es un proceso muy complejo que engloba diferentes mecanismos, tal y como sugieren Ahn et al. (2009), y que involucra factores fisicoquímicos y microbiológicos que no son excluyentes entre sí. En la Tabla 2.1 se presentan las principales teorías y modelos de granulación. En los siguientes apartados se describen los aspectos más relevantes de algunos de ellos.

2.1.1 Teorías fisicoquímicas

Las teorías y modelos fisicoquímicos explican el fenómeno de la granulación atendiendo a las condiciones fisicoquímicas que prevalecen en el reactor. Entre ellas destacan las velocidades del líquido y del biogás, la concentración de los sólidos suspendidos del inóculo o del efluente, las interacciones fisicoquímicas entre los microorganismos, o entre los microorganismos y otras partículas del medio, incluyendo las respectivas fuerzas intermoleculares. Aunque las teorías termodinámicas también corresponden a teorías fisicoquímicas, se han clasificado aparte, ya que explican la formación de gránulos en términos de la energía involucrada en las interacciones microbianas.

Modelo del núcleo inerte

Entre las primeras teorías que explican el proceso de granulación se encuentra el modelo del núcleo inerte, propuesto por Lettinga (1980). En presencia de partículas inertes los microorganismos anaerobios se pueden adherir a su superficie y formar una biopelícula. Así, el modelo del núcleo inerte sugiere que la granulación comienza con la adhesión de los microorganismos a la superficie de micropartículas inertes presentes en el afluente o adicionadas al reactor, dando lugar a la formación de núcleos embrionarios que se desarrollan hasta formar gránulos maduros debido al crecimiento de los microorganismos adheridos (Lettinga et al., 1980; Liu et al., 2003). Con el fin de acelerar el proceso de granulación, se ha investigado el efecto de la adición de diferentes tipos de materiales inertes. La zeolita (Yoda et al., 1989), el carbón activado en polvo y granular (Yu et al., 1999) y las esferas de alcohol polivinílico (PVA) (Wenjie et al., 2008) se han utilizado con éxito como núcleos bioportadores para la formación de gránulos.

Tabla 2.1. Teorías y modelos propuestos en el proceso de granulación anaerobia (adaptada de Hulshoff Pol et al., 2004; McHugh et al., 2003).

Teorías	Teoría/Modelo	Referencia
Fisicoquímicas	Modelo del núcleo inerte	(Lettinga et al., 1980)
	Teoría de la presión selectiva	(Hulshoff Pol et al., 1983)
	Crecimiento de sólidos suspendidos colonizados	(Pereboom, 1994)
	Modelo de unión a iones positivos multivalentes	(Mahoney et al., 1987; Schmidt y Ahring, 1993; Vlyssides et al., 2008)
	Modelo de unión a EPS	(Schmidt y Ahring, 1994)
Estructurales/ Ecológicas	Modelo de unión de microflóculos mediante filamentos de <i>Methanosaeta</i>	(Dubourgier et al., 1987)
	Hipótesis "Cape town"	(Sam-soon et al., 1987)
	Teoría del "espagueti"	(Wiegant, 1987)
	Modelo multicapa	(Macleod et al., 1990)
Termodinámicas	Modelo de microcolonias sintróficas	(Hirsh, 1984)
	Modelo de deshidratación local e interacción hidrofóbica	(Wilschut y Hoekstra, 1984)
	Modelo de tensión superficial	(Thaveesri et al., 1995a)
	Modelo de cuatro pasos	(Schmidt y Ahring, 1996)
	Teoría de translocación - deshidratación de protones	(Tay et al., 2000)
	Modelo de formación de núcleos cristalizados	(Zhu et al., 1997)
Otras	Modelo de comunicación entre células	(Davies et al., 1998)
	Modelo del autómeta celular	(Wimpenny y Colasanti, 1997)
	Modelo general de granulación	(Liu et al., 2003)

Teoría de la presión selectiva

En esta teoría se concibe el proceso de granulación anaerobia como el resultado de una selección continua del fango mediante el lavado de partículas ligeras y dispersas no aptas para la formación de gránulos, mientras que las partículas más pesadas se retienen en el reactor propiciando el crecimiento de agregados. La presión selectiva corresponde al patrón de flujo ascendente inducido por las velocidades del líquido y del gas (que a su vez depende de la carga orgánica aplicada), y que inciden en la selección entre partículas de fango con diferentes características de sedimentación. En general, una presión selectiva alta es adecuada para la formación de gránulos (Hulshoff Pol et al., 1983; Hulshoff Pol, 1989), ya que la velocidad ascendente induce el lavado de las partículas más ligeras presentes en el inóculo. Así, el crecimiento de biomasa se limita al crecimiento de núcleos retenidos en el reactor, que bien pueden ser partículas portadoras de biomasa de naturaleza orgánica o inorgánica, o pequeños agregados de microorganismos que componen el fango (Hulshoff Pol et al., 2004). Estas estructuras aumentan de tamaño y densidad hasta un valor máximo, a partir del cual se fragmentan generando nuevos gránulos. En contraste, la aplicación de una presión selectiva baja propicia el crecimiento de partículas dispersas y de baja densidad, y como resultado se obtiene un fango voluminoso con características de sedimentación deficientes. (Alphenaar, 1995; Hulshoff Pol et al., 2004).

Modelo de unión a sustancias poliméricas extracelulares

Las sustancias poliméricas extracelulares, o EPS por sus siglas en inglés (extracellular polymeric substances), son compuestos de alto peso molecular secretados por los microorganismos, y productos de la lisis celular y la hidrólisis de macromoléculas. Las EPS consisten principalmente en polisacáridos, proteínas, sustancias húmicas, ácidos nucleicos y urónicos (Ding et al., 2015). Se ha evidenciado que estas sustancias están involucradas en los fenómenos de adhesión, en la fisiología microbiana y en la estructura y estabilidad de los gránulos (Y.-Q. Liu et al., 2004). En el modelo de unión a EPS se establece que éstas sustancias intervienen en la cohesión y adhesión de las células mediante interacciones hidrofóbicas o mediante interacciones físicas al modificar la carga de la superficie de los microorganismos y al proveer una matriz para la inmovilización de los mismos (Schmidt y Ahring, 1994; Sheng et al., 2010). Además del contenido de EPS, su distribución en diferentes fracciones afecta al proceso de granulación. Se han

descrito tres fracciones de las EPS cuya distribución puede influenciar de manera diferente las propiedades superficiales de los agregados: las EPS en el licor de mezcla, las EPS débilmente adheridas a los agregados y las EPS fuertemente adheridas (Liu et al., 2010; Zhen et al., 2013). Las EPS del licor de mezcla se encuentran distribuidas uniformemente en la fase líquida. Las EPS débilmente adheridas se encuentran distribuidas en la capa exterior de los gránulos y el exceso de su producción puede deteriorar las características estructurales del fango granular (Liu et al., 2010; Lu et al., 2015a). Por otra parte, las EPS fuertemente adheridas se encuentran distribuidas en la parte interna de los gránulos y, suelen considerarse la matriz estructural que media la adhesión entre células y proporciona resistencia a los agregados (Lu et al., 2015a; Zhen et al., 2013).

Modelo de unión a iones positivos multivalentes

El modelo de unión mediante iones positivos multivalentes se fundamenta en la interacción electrostática entre los microorganismos cargados negativamente y los iones positivos presentes en el medio. Dado que en las condiciones de pH al cual operan los sistemas anaerobios la superficie de los microorganismos está cargada negativamente (Liu et al., 2003), la adición de iones positivos multivalentes reduce parcialmente las fuerzas de repulsión electrostática entre los microorganismos, permitiendo la interacción entre células, propiciando el proceso de granulación. Los iones positivos multivalentes también pueden promover la granulación mediante su unión con las EPS secretadas por los microorganismos (Bourven et al., 2015; Ding et al., 2015). Por ejemplo, se ha demostrado la interacción entre las EPS y el calcio para formar una estructura tridimensional en la que tiene lugar el crecimiento de las comunidades microbianas, y el desarrollo posterior de los gránulos (Ismail et al., 2010; Sutherland, 2001).

2.1.2 Teorías estructurales y ecológicas

La observación de las características estructurales de los gránulos y de su microbiología, en relación con las condiciones hidrodinámicas del reactor, las características del sustrato y los perfiles de concentración a lo largo del reactor, constituyen el fundamento de las teorías estructurales y ecológicas.

Teoría del “Espagueti”

Wiegant (1987) propuso un modelo para la formación de gránulos en reactores UASB que tratan aguas residuales con ácidos grasos volátiles y en los que *Methanosaeta* es el metanógeno predominante. En este modelo, la formación de gránulos procede en dos etapas: 1) formación de precursores y 2) crecimiento de los gránulos a partir de estos precursores. En la primera etapa, filamentos de *Methanosaeta* forman agregados muy pequeños o se adhieren a partículas finas dispersas en el medio. La selección de los agregados se realiza imponiendo una velocidad de flujo ascendente creciente (presión selectiva). En la siguiente etapa, el crecimiento individual de los microorganismos en los agregados, y su unión con otros microorganismos no adheridos, conduce al aumento del tamaño de los precursores. Estas partículas adquieren una forma esférica debido a las fuerzas de cizalladura generadas por la velocidad ascendente del líquido y del biogás. En esta etapa, los agregados presentan una apariencia filamentosa semejante a una esfera de espaguetis formada por filamentos de *Methanosaeta*. El crecimiento de los microorganismos en el sistema como consecuencia de un alto tiempo de retención de sólidos propicia que aparezcan gránulos más densos y compactos.

De acuerdo con Wiegant (1987), en reactores en los que las especies del género *Methanosarcina* son predominantes, la formación de gránulos también tiene lugar de manera espontánea. Sin embargo, estos gránulos presentan una conformación estructural más débil que puede conllevar problemas operacionales. Por consiguiente, cuando la abundancia relativa de *Methanosaeta* no es lo suficientemente alta en el inóculo, se debe imponer una fuerte selección hacia este microorganismo. Concentraciones bajas de ácido acético ($< 200 \text{ mg L}^{-1}$) durante la puesta en marcha de reactores UASB favorecen la predominancia del género *Methanosaeta* sobre *Methanosarcina* (Vavilin et al., 2008; Zheng et al., 2006).

Unión de microflóculos mediante filamentos de *Methanosaeta*

Este mecanismo, propuesto por Dubourgier et al. (1987), sugiere que el proceso de granulación comienza con el recubrimiento de filamentos de *Methanosaeta* por colonias de cocos y bacilos (bacterias acidogénicas) para formar microflóculos de 10 a 50 μm . Posteriormente, y gracias a su morfología particular y propiedades superficiales, los filamentos de *Methanosaeta* establecen uniones entre varios microflóculos formando gránulos más grandes ($>200 \mu\text{m}$). El desarrollo

posterior de las bacterias acidogénicas y de los microorganismos sintróficos favorece el crecimiento de los gránulos. Los autores consideran que las especies de *Methanosaeta* desempeña un papel crucial en la resistencia de los gránulos al formar una red que estabiliza su estructura general, sin desestimar la función de las EPS y de las propiedades de la pared celular de los microorganismos (de Zeeuw, 1987). En estudios recientes, Gagliano et al. (2017) y Sudmalis et al. (2018) demostraron la posibilidad de obtener gránulos con una buena estabilidad estructural en reactores UASB que trataban afluentes con concentraciones de sodio de hasta $20 \text{ mg Na}^+ \text{ L}^{-1}$. Estos autores encontraron que las especies del género *Methanosaeta* que presentan una morfología filamentosa, como *Methanosaeta harundinacea*, fueron predominantes en el fango y desempeñaron un papel fundamental para la formación de gránulos estables.

Modelo multicapa

De acuerdo con este modelo, propuesto por Macleod et al. (1990), los gránulos están estructurados en diferentes capas en las que la composición microbiológica difiere. La capa interna se compone principalmente de especies de *Methanosaeta*, que actúan como centros de nucleación para iniciar la formación de gránulos. Las bacterias acetogénicas y los organismos consumidores de hidrógeno conforman una segunda capa alrededor de los núcleos de *Methanosaeta*, mientras que las bacterias fermentativas se adhieren a este agregado formando la capa exterior del gránulo. Los productos de las bacterias fermentativas sirven como sustrato a los acetógenos subyacentes y estos proveen el sustrato a los metanógenos. Esta disposición espacial de los diferentes grupos tróficos garantiza una alta actividad metanogénica (Hulshoff Pol et al., 2004). Aunque el modelo multicapa de Macleod et al. (1990) ha sido respaldado por las observaciones de otros investigadores mediante hibridación fluorescente in situ y microscopía confocal de barrido por láser (Diaz et al., 2006; Satoh et al., 2007; Zheng et al., 2006), otros autores han encontrado que los gránulos también pueden presentar una estructura homogénea (Fang et al., 1995; Zhou et al., 2007) o en forma de racimos (González-Gil et al., 2001). Las diferentes conformaciones estructurales parecen depender de la composición y concentración del agua residual, de las rutas metabólicas dominantes y de las limitaciones de espacio en el gránulo (González-Gil et al., 2001; Guiot et al., 1992; Jiang et al., 2016; Schmidt y Ahring, 1996).

2.1.3 Teorías termodinámicas

Algunos investigadores han analizado la granulación anaerobia en términos de la energía involucrada en el proceso de adhesión microbiana. En los modelos termodinámicos se consideran factores como la hidrofobicidad celular y la movilidad electroforética, así como la influencia de la actividad de translocación de protones a través de la superficie de las membranas microbianas.

Modelo de tensión superficial

El modelo de tensión superficial relaciona la formación de biomasa granular en reactores UASB con la termodinámica implicada en las interacciones a nivel superficial. Thaveesri et al. (1995a) encontraron que la energía libre de adhesión (ΔG_{adh}) de los microorganismos sólo es favorable cuando la tensión superficial de la fase líquida se encuentra en un intervalo determinado. Sistemas con una tensión superficial del líquido baja ($< 50 \text{ mN m}^{-1}$) favorecen la adhesión de microorganismos hidrofílicos; mientras que sistemas con una tensión superficial del líquido alta ($> 55 \text{ mN m}^{-1}$) favorecen la adhesión de microorganismos hidrofóbicos. En el intervalo de tensiones superficiales del líquido de 50 a 55 mN m^{-1} la adhesión de microorganismos, ya sean hidrofóbicos o hidrofílicos, no es favorable debido a un potencial bajo de la energía libre de adhesión. De acuerdo con este postulado, y considerando que los acetógenos y los metanógenos son hidrofóbicos, mientras que los acidógenos son hidrofílicos (Daffonchio et al., 1995), Thaveesri et al. (1995a) han sugerido que en sistemas que operan a tensiones superficiales de líquido bajas se promueve la formación de agregados con una estructura multicapa en la que los acidógenos se encuentran alrededor de los acetógenos y los metanógenos, estos últimos ubicados en la capa interior. Según estos autores, este tipo de agregados permiten una operación estable debido a que son menos susceptibles a la adhesión de burbujas de biogás a su superficie y, por tanto, a ser lavados en el efluente del sistema. Por otra parte, en medios en los que la tensión superficial es alta, los gránulos tienen una superficie hidrofóbica (enriquecida con metanógenos) sobre la cual las burbujas de biogás pueden adherirse, siendo más propensos al lavado afectándose la estabilidad del reactor.

Teoría de translocación-deshidratación de protones

Tay et al. (2000) propusieron una teoría que describe el mecanismo molecular de la formación de gránulos. En esta teoría, que se fundamenta en la actividad de translocación de protones en la superficie de la membrana celular bacteriana, el proceso de granulación procede en cuatro etapas: 1) la deshidratación de las superficies bacterianas, 2) la formación de gránulos embrionarios, c) la maduración de los gránulos y 4) la post-maduración de los gránulos.

La interacción hidrofóbica entre las superficies de los microorganismos se considera un factor importante para que la adhesión microbiana se inicie (Y. Liu et al., 2004). No obstante, debido a que bajo condiciones fisiológicas normales la superficie de las células se encuentra hidratada como resultado de los puentes de hidrógeno entre las cargas negativas y las moléculas de agua, se produce la repulsión entre éstas. En la teoría desarrollada por Tay et al. (2000) se argumenta que, durante la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos, las bacterias acidogénicas bombean protones desde el citoplasma hacia el exterior de la célula. Esta translocación de protones provoca la ruptura de los enlaces de hidrógeno, produciéndose así la neutralización parcial de las cargas y la deshidratación de las superficies, el primer paso para la formación de los gránulos. En la segunda etapa se forman gránulos embrionarios mediante la adhesión de las bacterias acidogénicas, las bacterias acetogénicas y las arqueas metanogénicas. Estos gránulos embrionarios continúan creciendo en la etapa de maduración por el crecimiento de las colonias de microorganismos y la adhesión de otras partículas dispersas. En la etapa de post-maduración, la actividad de translocación de protones mantiene la superficie de los microorganismos en condiciones hidrofóbicas, siendo este el mecanismo responsable del mantenimiento de la estructura granular. Por otra parte, tras la etapa de adhesión, los microorganismos producen EPS que recubren la superficie de los gránulos. La naturaleza hidrofílica que generalmente presentan las EPS protege los agregados de la adhesión de las burbujas de biogás y de las fuerzas de cizalladura al interior del reactor.

Modelo en cuatro pasos

Schmidt y Ahring (1996) postularon que existen cuatro pasos bien definidos en el desarrollo inicial de gránulos en reactores UASB. El proceso se inicia con el transporte de las células (por difusión, convección, flotación del gas y/o

sedimentación) hacia la superficie de un material de soporte inerte o de otras células. Posteriormente, se produce la adsorción inicial al soporte por fuerzas fisicoquímicas. Aunque reversible, la adsorción inicial puede conducir a la inmovilización de los microorganismos y es descrita por la teoría DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) a partir de los cambios en la energía libre de adhesión (Hulshoff Pol et al., 2004). El paso siguiente es la adhesión irreversible debido a características específicas de los microorganismos, la estructura de la superficie celular o la secreción de EPS. Finalmente, la multiplicación de las células adheridas al soporte resulta en el incremento del tamaño del agregado y en la formación del gránulo.

2.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE GRANULACIÓN

La obtención de un fango granular anaerobio con buenas características fisicoquímicas en un tiempo relativamente corto es de gran interés en la puesta en marcha de reactores de lecho granular, en particular del reactor UASB. No obstante, como se ha señalado, el prolongado periodo de puesta en marcha de este tipo de sistemas cuando se emplea como inóculo un fango en suspensión es uno de sus mayores inconvenientes, ocasionando costos operacionales adicionales y comprometiendo la calidad del efluente que se desea descargar (Liu et al., 2003). Dicho inconveniente puede superarse mediante el uso de un inóculo granular procedente de un sistema en operación, tal como se ha demostrado en la puesta en marcha de reactores EGSB o de circulación interna (van Lier, 2008). Sin embargo, la disponibilidad de fango granular es limitada y los costes de adquisición y transporte son extremadamente altos (Show, 2006). Además, una consideración importante para el uso de un fango granular como inóculo corresponde a la similitud entre la composición del sustrato del cual éste proviene y la del que se desea tratar. El cambio en la composición del sustrato puede inducir cambios estructurales en la conformación de los gránulos que podrían resultar en su ruptura parcial o completa, afectando a la eficacia del tratamiento (Liu et al., 2003; McHugh et al., 2003b; Oz et al., 2012). Por tanto, con el propósito de disminuir los costes económicos y para garantizar la operación adecuada del sistema de tratamiento, se requiere el rápido desarrollo de biomasa granular a partir de un fango en suspensión. Para ello, el conocimiento de los factores ambientales y operacionales que favorecen la formación de los gránulos resulta fundamental. A continuación, se describen los principales factores que influyen en el proceso de granulación anaerobia.

2.2.1 Características del inóculo

Los fangos anaerobios digeridos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales se han utilizado ampliamente para la puesta en marcha de reactores anaerobios debido a su disponibilidad y bajo costo de adquisición (Liu et al., 2002). de Zeeuw (1984) encontró que para la formación de gránulos es preferible un fango digerido con una concentración alta y una actividad metanogénica relativamente baja frente a un fango menos concentrado y más activo, principalmente debido al lavado selectivo de la biomasa que se espera durante la puesta en marcha del sistema. El uso de un fango anaerobio digerido concentrado conduce a una pérdida sustancial de la biomasa menos densa durante los primeros días de operación, dejando en el sistema un fango con buenas características de sedimentación y una actividad metanogénica específica relativamente baja que incrementa de manera progresiva al aumentar la carga orgánica volumétrica. Este tipo de lavado, denominado lavado por erosión, se debe a las diferencias en las características de sedimentación de las partículas y es adecuado para la formación de gránulos. En contraste, un fango diluido puede ser más homogéneo respecto a las características de sedimentación de las partículas que lo componen. Así, durante los primeros días de operación, el lavado de biomasa por erosión es bajo, pero si la actividad metanogénica es elevada puede tener lugar la expansión del lecho y el lavado de biomasa activa.

La presencia y abundancia de microorganismos específicos en el inóculo también puede ser determinante en la formación de gránulos. Los microorganismos anaerobios pueden diferir en su capacidad de agregación, siendo algunas especies microbianas más competentes que otras para la formación de gránulos. El-Mamouni et al. (1997) evaluaron la influencia de diferentes precursores para la formación de gránulos: consorcios metanogénicos enriquecidos con microorganismos sintróficos, núcleos enriquecidos con *Methanosaeta*, núcleos enriquecidos con *Methanosarcina* y flóculos acidogénicos. La granulación ocurrió rápidamente en el fango enriquecido con el consorcio sintrófico y los núcleos enriquecidos con *Methanosaeta* y *Methanosarcina*, con velocidades de crecimiento de 31, 21, y 18 $\mu\text{m d}^{-1}$, respectivamente, pero se retrasó de manera significativa al utilizar los flóculos acidogénicos como precursores, 7 $\mu\text{m d}^{-1}$. Como se ha indicado en los modelos y mecanismos de granulación expuestos en el apartado 2.1,

Methanosaeta y *Methanosarcina* se consideran los principales metanógenos responsables de la formación núcleos que resultan en gránulos. El primero destaca por sus buenas capacidades de adhesión y el segundo por su habilidad para crecer en racimos —sobre los cuales *Methanosaeta* puede adherirse— mediante la secreción de EPS (Hulshoff Pol et al., 2004). En la bibliografía se ha señalado la importancia de *Methanosaeta* en el proceso de granulación anaerobia y se recomienda mantener condiciones adecuadas que propicien su predominancia durante la puesta en marcha de reactores UASB (Diaz et al., 2006; Gagliano et al., 2017; Li et al., 2015; Sudmalis et al., 2018; Wiegant, 1987; Zheng et al., 2006).

2.2.2 Características del agua residual

El fenómeno de granulación anaerobia puede ocurrir con diferentes tipos de aguas residuales y en un amplio intervalo de concentraciones, como refleja la bibliografía ampliamente descrita (Bhunja y Ghangrekar, 2008; Ramakrishnan y Gupta, 2006; Sponza, 2002; Sudmalis et al., 2018; Tiwari et al., 2006; Tsushima et al., 2010; Yan y Tay, 1996). Las características del sustrato orgánico (composición y concentración) influyen en la formación, la composición y la estructura de los gránulos anaerobios (Liu et al., 2002; Zhou et al., 2006). La complejidad del sustrato puede ejercer una presión selectiva sobre la diversidad microbiana y, de manera consecuente, incidir en la formación y microestructura de los gránulos. Xing et al. (2017) evaluaron el efecto de cuatro tipos de aguas residuales sintéticas contaminadas con diferentes sustratos orgánicos: triptona, acetato/propionato, glucosa y etanol, en la estructura de las comunidades microbianas de reactores anaerobios por lotes secuenciales o ASBR por sus siglas en inglés (anaerobic sequencing batch reactor) a escala de laboratorio. Se evidenció el impacto de la fuente de carbono en las rutas predominantes para la producción de metano y en la estructura microbiana. Cuando los sustratos en el agua residual fueron triptona y acetato/propionato, la metanogénesis acetoclástica fue la principal ruta para la producción de metano, con *Methanosarcina* como el metanógeno más abundante. Cuando se alimentó glucosa o etanol, la metanogénesis acetoclástica y la metanogénesis hidrogenotrófica se utilizaron simultáneamente y *Methanosarcina* y *Methanobacterium* fueron los metanógenos predominantes.

La variación de la fuente de carbono también puede causar cambios graduales en la estructura física, en la distribución microbiana y en las características de

sedimentación de la biomasa, y conducir a la desintegración o flotación del fango granular (Lu et al., 2015a; Seghezzo, 2004). Al respecto, Hulshoff Pol (1989) señaló que el cambio de un agua residual sintética compuesta por una mezcla de ácidos grasos volátiles a otra compuesta por carbohidratos provocó problemas de flotación y la formación de un fango voluminoso.

Por su parte, Fukuzaki et al. (1995) evaluaron la formación de gránulos y sus características fisicoquímicas en reactores UASB operando a largo plazo (500 días) y alimentados con diferentes fuentes de carbono: almidón, sacarosa, etanol y una mezcla de butirato y propionato. Los resultados evidenciaron el efecto de la composición del sustrato sobre las poblaciones microbianas y las características fisicoquímicas de los gránulos. Debido a la deficiencia de carbohidratos en la corriente de entrada, la población de bacterias hidrolíticas-acidogénicas disminuyó drásticamente en los gránulos formados con etanol o ácidos grasos volátiles como sustrato. La composición del sustrato afectó también al tamaño de los gránulos; frente a los gránulos formados con almidón o sacarosa, se observaron gránulos con un tamaño un 52-59 % inferior con el agua residual contaminada con etanol, y un 70-74 % inferior con la alimentación de ácidos grasos volátiles. La cantidad de EPS de estos gránulos también fue inferior en comparación con los gránulos desarrollados con almidón o sacarosa como sustrato. Considerando la producción de EPS y los microorganismos presentes en cada reactor según el tipo de sustrato utilizado, se determinó que las bacterias hidrolíticas-acidogénicas son productoras de abundantes cantidades de EPS, no así las bacterias acetogénicas sintróficas que degradan etanol y ácidos grasos volátiles o los metanógenos. Así, la producción de EPS, indispensable para la formación y mantenimiento de los gránulos, puede verse limitada en los sistemas alimentados con sustratos acetogénicos y metanogénicos en comparación con los sistemas que tratan aguas residuales complejas ricas en sustratos acidogénicos (Lu et al., 2015a; Schmidt y Ahring, 1996; Zhou et al., 2006).

Kobayashi et al. (2011) evaluaron el efecto de la adición de almidón sobre la operación y la composición microbiológica de un reactor UASB que trataba un agua residual contaminada con metanol. Los autores encontraron que la adición de almidón estimuló la formación de gránulos, mejorando la capacidad de tratamiento del reactor. Los resultados del análisis de las comunidades microbianas mostraron la predominancia del género *Methanosaeta*, probablemente debido a la disponibilidad de acetato procedente de la degradación del almidón, contribuyendo al desarrollo de los gránulos. Este efecto de la composición del sustrato puede ser

especialmente importante en la granulación en reactores anaerobios alimentados con aguas residuales que contienen compuestos de síntesis química de manera mayoritaria, y que no contienen sustratos complejos como carbohidratos o proteínas. Tal es el caso de las emisiones atmosféricas del sector flexográfico, cuya absorción en agua para su posterior tratamiento anaerobio genera una corriente residual con un contenido mayoritario en etanol (Bravo et al., 2017).

2.2.3 Carga orgánica

La carga orgánica es uno de los parámetros operacionales más importantes en el proceso de granulación anaerobia. Se ha demostrado que el incremento gradual de la carga orgánica promueve la formación de gránulos durante la puesta en marcha de reactores anaerobios (Hulshoff Pol et al., 2004; Kosaric et al., 1990; Show et al., 2004; Tay y Yan, 1996; Zhou et al., 2007). Dicho incremento gradual se efectúa aumentando de manera progresiva la concentración o el caudal del afluente. Sin embargo, la variación de cualquiera de estos dos parámetros debe realizarse de forma cuidadosa, debido a que el proceso de degradación anaerobia es muy sensible a la carga orgánica aplicada. Un aumento rápido de la concentración del afluente puede conducir a la acidificación del sistema, mientras que la aplicación de elevados caudales puede provocar el lavado de la biomasa. Además, puesto que la producción de biogás es proporcional a la carga orgánica aplicada, un valor muy alto durante la puesta en marcha podría resultar en el lavado del fango anaerobio por arrastre y desintegración de la biomasa como resultado de la turbulencia y el esfuerzo cortante generados por el aumento de la producción de biogás. Lettinga (1995) recomienda el aumento gradual de la carga orgánica hasta alcanzar una eficacia de eliminación de la DQO de al menos un 80 % manteniendo la concentración de ácido acético por debajo de 200 mg L^{-1} para favorecer el crecimiento de microorganismos con una alta afinidad por este compuesto, es decir, especies del género *Methanosaeta* (Wiegant, 1987; Zheng et al., 2006). Por otro lado, un ajuste adecuado de la carga hidráulica y de la velocidad del biogás propiciará la presión selectiva necesaria para promover la formación de gránulos. van Lier et al. (2008) han descrito el efecto del aumento de la carga orgánica sobre la granulación en tres fases: en la primera fase, operando a una carga orgánica baja ($< 3 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), se produce la expansión del lecho y el lavado de material coloidal; durante esta fase se puede observar flotación de partículas mientras la actividad metanogénica específica comienza a aumentar. En una segunda fase, el

aumento de la carga orgánica provoca una fuerte eliminación de sólidos ligeros y la selección de las partículas más pesadas. En esta fase tiene lugar la formación de agregados densos. En la tercera fase, con el aumento de la concentración de fango en el reactor y de la cantidad de gránulos puede continuar aumentándose la carga orgánica aplicada.

2.2.4 Velocidad ascensional y tiempo de retención hidráulico

Una observación general en el proceso de granulación anaerobia es que éste procede bien a velocidades ascensionales del líquido relativamente altas al ejercer una selección en la ecología microbiana de acuerdo con la teoría de la presión selectiva (Hulshoff Pol, 1989). La aplicación de tiempos de retención cortos junto con velocidades ascensionales altas propicia el lavado de biomasa dispersa o ligera y promueve la granulación. En contraste, los tiempos de retención prolongados permiten el crecimiento de la biomasa dispersa, lo cual es menos favorable para la formación de gránulos (Alphenaar, 1995). Los sistemas UASB son los reactores de lecho granular en los que la granulación se ha estudiado con mayor frecuencia. Cuando se inoculan con un fango en suspensión, se recomiendan velocidades ascensionales entre 0.5 y 1 m h⁻¹ para promover la formación de gránulos (Lim y Kim, 2014; O'Flaherty et al., 1997; Tiwari et al., 2006), mientras se aplican tiempos de retención inferiores a 48 horas (Nicolella et al., 2000). Velocidades ascensionales por encima de estos valores pueden conducir a la desintegración de los gránulos formados debido a las fuerzas de cizalladura dentro del reactor (Kosaric et al., 1990).

O'Flaherty et al. (1997) evaluaron el funcionamiento de dos reactores híbridos de flujo ascendente alimentados con aguas residuales con diferentes tipos de sustrato orgánico: lactosa y una mezcla de etanol, propionato y butirato operando a una carga orgánica de 3.7 kg DQO m⁻³ d⁻¹ y una velocidad ascensional del líquido de 0.01 m h⁻¹. En ambos reactores se desarrolló un fango floculento tras 273 días de operación. No obstante, al inocular un tercer reactor con el fango formado en el reactor alimentado con la mezcla de etanol y AGV, ajustando la velocidad ascensional del líquido en un valor de 0.5 m h⁻¹, se produjo la granulación del fango. La granulación redujo la susceptibilidad del lodo a la flotación.

2.2.5 Temperatura

Los microorganismos metanogénicos crecen lentamente y sus tiempos de generación varían de 3 a 50 días a 35 y 10 °C, respectivamente (Bitton et al., 2016). Se espera entonces que la granulación anaerobia proceda mejor en condiciones mesofílicas óptimas y termofílicas (Lettinga, 1995). Cuando la temperatura del reactor se encuentra por debajo de 30 °C, la actividad de los metanógenos se reduce de manera considerable. Ahora bien, aunque la temperatura puede aumentar la velocidad de granulación, tampoco son adecuados valores demasiado altos, ya que pueden perjudicar la actividad de los microorganismos (Show, 2006). El proceso de granulación anaerobia puede mejorarse al incrementar la temperatura en el intervalo mesofílico hasta valores cercanos a 40° durante la puesta en marcha de reactores UASB. Sin embargo, se ha reportado que los gránulos formados en estas condiciones son más vulnerables a perturbaciones en la operación del sistema, como a los cambios de pH y de temperatura (Hulshoff Pol, 1989).

Si bien el proceso de granulación se dificulta a temperaturas inferiores a 25 °C y el tiempo de puesta en marcha del sistema puede prolongarse (Sayed, 1987), diversos estudios han abordado con éxito la formación de gránulos en condiciones mesofílicas subóptimas y en condiciones psicrófilicas, cuyo interés se encuentra en la posibilidad de expandir la aplicación de los reactores de lecho granular en diferentes sectores industriales, así como en el tratamiento de aguas residuales urbanas (O'Reilly et al., 2010, 2009a; Yan y Tay, 1996). O'Reilly et al. (2010) reportaron la formación de biomasa granular en reactores EGSB operados a 15 °C. A partir del análisis microbiológico de los gránulos, estos autores sugirieron que el orden *Methanomicrobiales*, en particular, las especies del género *Methanocorpusculum*, desempeñan un papel importante en el proceso de granulación anaerobia a baja temperatura.

2.2.6 Hidrofobicidad celular

La hidrofobicidad celular ha sido considerada uno de los factores de mayor incidencia en la agregación microbiana (Tay et al., 2000). Esta propiedad describe las características de una molécula o de una estructura para ser rechazada por un medio acuoso. Desde un enfoque termodinámico, la agregación microbiana es impulsada por la disminución en la energía libre de adhesión. El incremento en la

hidrofobicidad de la superficie celular causaría la disminución de la energía libre de Gibbs en exceso, promoviendo la interacción entre células y la agregación celular fuera de la fase líquida. Las características del sustrato, el pH, la temperatura, la presión selectiva, las condiciones de inanición, la velocidad de crecimiento de los microorganismos y la producción de EPS son factores que afectan a la hidrofobicidad de la superficie celular (Cao et al., 2017; Y. Liu et al., 2004).

2.2.7 Adición de cationes multivalentes, polímeros y materiales inertes

La adición de cationes multivalentes, algunos polímeros catiónicos (naturales o sintéticos) y materiales inertes ha mostrado un efecto positivo en el proceso de granulación anaerobia. En cuanto a los cationes, éstos pueden acelerar la formación de gránulos al disminuir la carga negativa de la superficie de las células y al interactuar con las EPS secretadas por los microorganismos (Liu et al., 2003). Se ha observado que la adición de Ca^{2+} (Mahoney et al., 1987; Yu et al., 2001b), Mg^{2+} (Schmidt y Ahring, 1993), Fe^{2+} (Vlyssides et al., 2009) o Al^{+3} (Yu et al., 2001a) propicia la formación de gránulos anaerobios en función de la concentración aplicada. Como ejemplo, Yu et al. (2001b) observaron que concentraciones de Ca^{2+} entre 150 y 300 mg L^{-1} fueron beneficiosas para la formación de gránulos en reactores UASB alimentados con un agua residual sintética, y concentraciones superiores a 600 mg L^{-1} fueron perjudiciales. Asimismo, Gagliano et al. (2017) reportaron que la adición de 1 g L^{-1} de Ca^{2+} tuvo un efecto negativo en la formación de biopelículas y en el rendimiento del proceso de degradación en un reactor UASB alimentado con un agua residual sintética de salinidad alta (10 y 20 $\text{g mg Na}^+ \text{L}^{-1}$), aunque mostró un efecto positivo en el fortalecimiento de los gránulos. Concentraciones altas de Ca^{2+} pueden causar, además, problemas de operación, incluyendo la precipitación de calcio sobre la superficie de los gránulos y su acumulación en el interior de los mismos con la consecuente disminución de la actividad metanogénica (Liu et al., 2003).

La adición de polímeros naturales o sintéticos durante la puesta en marcha de reactores de alta carga también puede estimular la formación de biomasa granular. En la Tabla 2.2 se presenta una revisión de los polímeros reportados en la bibliografía cuya adición ha demostrado mejorar la formación de gránulos anaerobios. En particular, los polímeros catiónicos naturales han evidenciado un buen efecto en la disminución del tiempo de obtención de gránulos con buenas características fisicoquímicas. Esta mejora se ha atribuido a su estructura

polisacárida, la cual permite que actúen de manera semejante a las EPS secretadas por los microorganismos de forma natural (El-Mamouni et al., 1998). También se ha sugerido que el mecanismo involucrado en la mejora del proceso de granulación por parte de los polímeros es similar al de los iones multivalentes, es decir, los polímeros catiónicos disminuirían las fuerzas de repulsión entre los microorganismos al modificar su carga superficial, lo cual favorecería la granulación (McHugh et al., 2003b).

Tabla 2.2. Polímeros naturales y sintéticos que estimulan la formación de gránulos anaerobios.

	Polímero	Sustrato orgánico	Referencia
Natural	Quitosano	Etanol y sacarosa (1:1)	(El-Mamouni et al., 1998)
		Ácidos grasos volátiles	(Hudayah et al., 2016)
		Glucosa	(Ariyavongvivat et al., 2015)
		Disolventes orgánicos	(Lafita et al., 2017)
	WEMOS	Agua residual doméstica	(Kalogo et al., 2001)
Sintético	Percol 763	Etanol y sacarosa (1:1)	(El-Mamouni et al., 1998)
	Poliacrilamida	Ácidos grasos volátiles	(Hudayah et al., 2012)
		Glucosa	(She et al., 2012)
	AA 184 H	Glucosa	(Show et al., 2004)
	Kymene SLX-2	Agua residual de helados	(Uyanik et al., 2002)

Entre los polímeros catiónicos, el quitosano, un polisacárido lineal compuesto por D-glucosamina y N-acetilglucosamina y sintetizado a partir de la desacetilación alcalina de la quitina, destaca por su disponibilidad, biodegradabilidad y ventajas ecológicas (Yang et al., 2016). Se ha demostrado su efecto positivo tanto en la formación de biomasa granular como en la producción de biogás (El-Mamouni et al., 1995; Khemkhao et al., 2016, 2011). La adición de este polímero se ha estudiado en la granulación de fangos anaerobios alimentados con diferentes tipos de sustratos. El-Mamouni et al. (1998) evaluaron la influencia de la adición de quitosano en la velocidad de granulación de un fango desintegrado en reactores UASB alimentados con sacarosa y con una mezcla de sacarosa y etanol. La velocidad de crecimiento del tamaño de los gránulos se aceleró en 37 y 33 $\mu\text{m d}^{-1}$ para los reactores alimentados con sacarosa y con la mezcla, respectivamente, en comparación con un reactor de control sin adición del polímero. La formación más rápida de gránulos se atribuyó a la estructura química del polímero, similar a la de las EPS; las cadenas poliméricas

podrían formar uniones entre superficies microbianas promoviendo la formación de los núcleos iniciales que posteriormente crecerán hasta constituir agregados. La actividad metanogénica específica de la biomasa suplementada con quitosano también fue superior a la del reactor de control.

En otro estudio, Hudayah et al. (2016) reportaron el efecto positivo del quitosano en la formación de núcleos sintróficos y en la formación temprana de biomasa granular en un reactor UASB alimentado con ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico en una relación 2:1:1 en DQO). Después de 58 días de operación, se obtuvo un diámetro medio de partícula de 115 μm y un porcentaje de núcleos (100-600 μm) y gránulos (diámetro medio superior a 600 μm) del 55.1 y 8.2 %, respectivamente. Mediante mediciones del potencial zeta estos autores encontraron que la adición de quitosano redujo la carga negativa de la superficie de los microorganismos.

En un estudio reciente, Lafita et al. (2017) evaluaron la efectividad del quitosano en la re-granulación de un fango parcialmente desintegrado empleado como inóculo de reactores EGSB alimentados con una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol (relación másica 5:1). Se operaron dos reactores, uno suplementado con quitosano y otro sin quitosano. En el reactor con quitosano se obtuvieron gránulos con un tamaño medio de partícula un 16 % mayor que los gránulos del reactor de control, y con mejores características de sedimentación. Además, el tiempo requerido para obtener una eficacia de eliminación del 80 % del glicol éter 1-metoxi-2-propanol se redujo en dos semanas respecto al reactor de control. Ante la pérdida de la integridad estructural de los gránulos, la adición puntual de quitosano permitió recuperar las características fisicoquímicas de la biomasa, evitando así su lavado y el detrimento del proceso de degradación.

En cuanto a los principales mecanismos de floculación microbiana en presencia de quitosano, Yang et al. (2016) han sugerido que éstos están relacionados con la neutralización de cargas y la formación de puentes o enlaces entre los microorganismos. En sistemas anaerobios, la adición de quitosano puede modificar las propiedades superficiales de los microorganismos e influir en la asociación de células individuales. Además, el polímero también puede formar una matriz tridimensional relativamente estable dentro de la cual los microorganismos pueden reproducirse hasta crecer en forma de agregados (Liu et al., 2002).

Otro factor que contribuye al desarrollo de fango granular es la presencia de núcleos o bioportadores para la adhesión microbiana (Hulshoff Pol et al., 2004; Lettinga et al., 1980). En presencia de partículas inertes, la formación de gránulos se considera un fenómeno de formación de biopelícula, ya que depende de la adhesión de los microorganismos a la superficie del material y de su crecimiento sobre dicha superficie. De acuerdo con Yu et al. (1999), un material inerte adecuado para el desarrollo de gránulos debe poseer un área superficial elevada, una gravedad específica similar a la del fango granular, una forma esférica y una alta hidrofobicidad. En la Tabla 2.3 se muestran diferentes materiales inertes cuyo efecto en la aceleración de la formación de gránulos ha sido evidenciado.

Yu et al. (1999) investigaron el efecto de la adición de PAC y GAC como bioportadores para el desarrollo de gránulos en reactores UASB alimentados con glucosa como fuente principal de sustrato orgánico. En el reactor de control, sin la adición de bioportadores, la granulación de un fango en suspensión se alcanzó después de 95 días de operación, mientras que en los reactores con PAC y GAC sólo fueron necesarios 30 y 35 días, respectivamente. El efecto positivo de la adición de los bioportadores se atribuyó a la unión de microorganismos filamentosos a la superficie del carbón activado. Wenjie et al. (2008) evaluaron la adición de esferas de PVA para la formación de gránulos en un reactor UASB que trataba aguas residuales contaminadas con licor de maíz fermentado. Las esferas de PVA, que inicialmente eran blancas, se tornaron negras de forma progresiva debido a la adhesión y al crecimiento de los microorganismos sobre su superficie. Tras 117 días de operación también se observó la formación natural de otros agregados, aunque con un tamaño inferior a 300 μm , en poca cantidad, y con una forma irregular en comparación con las esferas de 2-3 mm de PVA.

Tabla 2.3. Diferentes materiales inertes utilizados para acelerar el proceso de granulación anaerobia (adaptada de Hulshoff Pol et al. 2004).

Material	Tamaño (mm)	Inóculo	Sustrato	Aceleración de la granulación (d)	Tamaño de los gránulos (mm)	Microorganismo predominante	Referencia
Espuma	5	Fango floculento	Propionato	-	7.8-8.0	<i>Methanosaeata</i>	(Fukuzaki et al., 1990)
Zeolita	0.1	Biopelículas	AGV	20	1.2-2.0	<i>Methanosaeata</i>	(Yoda et al., 1989)
Hydroantracita	0.1	Fango digerido no granular	AGV	14	2.0	<i>Methanosaeata</i>	(Hulshoff Pol, 1989)
WAP ¹	0.1-0.2	Fango digerido no granular	AGV	10	2.1-2.3	<i>Methanosaeata (filamentos)</i>	(Imai et al., 1997)
GAC ²	0.32	Fango digerido no granular	sacarosa	-	0.4	<i>Methanosaeata</i>	(Morgan et al., 1991)
GAC	0.4	Fango digerido no granular	Glucosa peptona y	35	2.0-2.4	<i>Methanosaeata</i>	(Yu et al., 1999)
PAC ³	0.2	Fango digerido no granular	extracto de levadura	30	2.0-2.4	<i>Methanosaeata</i>	
PVA ⁴	2-3	Fango digerido no granular	Licor de maíz fermentado	-	-	<i>Methanosarcina</i>	(Wenjie et al., 2008)

¹WAP: water absorbing polymer, polímero absorbente de agua; ²GAC: granular activated carbon, carbon granular activado; ³PAC: Powdered activated carbon, carbón activado en polvo; ⁴PVA: poly-vinyl alcohol, alcohol polivinílico.

Otros materiales inorgánicos como la arena o la arcilla también se han estudiado para acelerar la formación de biomasa granular (Hickey et al., 1991; Lettinga et al., 1980); no obstante, los resultados obtenidos parecen indicar que su adición no ejerce un efecto positivo en la formación de gránulos. Hickey et al. (1991) no encontraron diferencias en la granulación en condiciones termofílicas de un fango digerido con o sin la adición de partículas de arena, aunque se observó su presencia en el interior de los gránulos formados en el reactor al cual se añadió este material. La mayor gravedad específica de la arena respecto a la del fango anaerobio pudo propiciar su acumulación en el fondo del reactor, mientras que la biomasa se acumuló en la parte superior dificultando el contacto, y por tanto, la posibilidad de la adhesión microbiana (Hulshoff Pol et al., 2004; Imai et al., 1997).

2.3 GRANULACIÓN EN REACTORES DE ALTA CARGA APLICADOS AL TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES CONTAMINADAS CON DISOLVENTES ORGÁNICOS

Pese a que el proceso de granulación anaerobia ha sido estudiado en el tratamiento de distintos tipos de aguas residuales, se han reportado pocas investigaciones evaluando este fenómeno en reactores de alta carga empleados para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos oxigenados, a excepción del etanol. En este caso, se ha demostrado la formación de gránulos en reactores de flujo ascendente alimentados con etanol como única fuente de carbono y energía, o en mezclas con otro tipo de sustratos como ácidos grasos volátiles o carbohidratos (Dolfing, 1987; Fukuzaki et al., 1995; O'Flaherty et al., 1997; Puñal et al., 2003). En la Tabla 2.4 se presentan las condiciones de operación de diferentes estudios acerca de la formación de gránulos con aguas residuales sintéticas contaminadas con etanol como sustrato orgánico principal. Se puede destacar el estudio realizado por Fukuzaki et al. (1995), en el que los gránulos obtenidos tras 500 días de operación de un reactor UASB alimentado con un agua residual contaminada con etanol presentaron características fisicoquímicas diferentes a las de gránulos obtenidos con la alimentación de aguas residuales con almidón o sacarosa. Entre ellas, el menor tamaño de los gránulos y la menor producción de polímeros extracelulares se atribuyeron a las diferentes poblaciones de microorganismos enriquecidas en los gránulos. Los microorganismos responsables de la degradación del etanol hasta metano, bacterias acetogénicas y

Tabla 2.4. Revisión bibliográfica de las condiciones de operación aplicadas en estudios de granulación con disolventes de interés en la industria flexográfica.

Tipo de reactor	Tipo de inóculo	Sustrato (g DQO L ⁻¹)	CO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	TRH (d)	V _{as} (m h ⁻¹)	T (°C)	φ ¹ (μm)	EE (%)	Referencia
UASB híbrido	Fango flocculento	Etanol-AGV 12	1.4-5.6	8-2	0.5	35 ± 2	889 ± 67	>97	(O'Flaherty et al., 1997)
UASB	Fango granular	Etanol 6.5	36.5	0.18	-	37	870	92.6	(Fukuzaki et al., 1995)
UASB	Fango flocculento	Etanol-AGV- Glucosa 5	5	1	0.7	30	-	83.9 ± 8.2	(Puñal et al., 2003)
EGSB	Fango granular desintegrado	Etanol- M2p ² 2.1-6.2	15-27*	0.14-0.21	0.4-9.2	25	3268	>99	(Lafita et al., 2017)
UASB	Fango granular desintegrado	Etanol 34.9	20	1.8	-	30	-	>99	(Dolfing, 1987)

¹Diámetro medio de partícula; ²Relación en masa 5:1.

*CO: (kg DQO m⁻³lecho d⁻¹).

arqueas metanogénicas, mostraron una producción de EPS entre un 60 y un 68 % inferior a la producción de las comunidades de microorganismos involucradas en la degradación del almidón y de la sacarosa, que incluyen bacterias hidrolíticas-acidogénicas. Si bien la producción de EPS fue inferior, ésta fue suficiente para la formación de gránulos estables, permitiendo la aplicación de una carga orgánica de hasta $36.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ con un TRH de 4.3 horas, alcanzando una eficacia de eliminación del 88 %.

En un estudio más reciente, Lafita et al. (2017) evaluaron la granulación de un fango parcialmente desintegrado en un reactor EGSB alimentado con un agua residual sintética que contenía etanol y 1-metoxi-2-propanol en una relación másica 5:1. Los autores consiguieron incrementar el diámetro medio de partícula de los gránulos desde un valor promedio de $363 \mu\text{m}$ hasta valores en el intervalo comprendido entre 478 y $3268 \mu\text{m}$ tras 77 días de operación, y mejorar sus propiedades de sedimentación pudiendo incrementar la carga orgánica volumétrica desde 15 hasta $27 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ lecho d}^{-1}$ junto con la velocidad ascensional del líquido desde un valor de 0.4 m h^{-1} hasta un valor tan alto como 9.2 m h^{-1} , manteniendo la eficacia de eliminación de la materia orgánica en valores superiores al 99 %. Estos resultados demuestran la posibilidad de mejorar las características físicas de un fango parcialmente desintegrado en sistemas alimentados con corrientes que contienen disolventes orgánicos de interés industrial.

Por otro lado, un inconveniente que se ha reportado en la aplicación de reactores de lecho granular para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos es la desintegración parcial o total del fango anaerobio, ya sea por la exposición a disolventes orgánicos específicos (Henry et al., 1996), bajas temperaturas (Enright et al., 2009), o por la aplicación de altas cargas orgánicas (Lu et al., 2015a; Vermorel et al., 2017) y/o perturbaciones en el suministro de sustrato orgánico (Lafita et al., 2015). Henry et al. (1996) observaron la desintegración del fango granular en un reactor híbrido empleado para el tratamiento de aguas residuales de la industria farmacéutica contaminadas con etanol, metanol, acetato de etilo, y otros disolventes orgánicos como terbutanol, isopropanol, isobutanol y 2-butanol. La desintegración de los gránulos se observó operando a una carga orgánica de $6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ y un TRH de 2 días. Estos autores sugirieron que el deterioro de los gránulos pudo ser el resultado de una alta concentración de disolventes orgánicos que afectó la tensión superficial del agua residual, que a su vez puede afectar de manera adversa el proceso de granulación,

así como causar la flotación de los gránulos (Y. Liu et al., 2004; Thaveesri et al., 1995b). También se ha sugerido que los disolventes orgánicos oxigenados como los ésteres, por ejemplo, el acetato de etilo, pueden penetrar y alterar la función de las membranas celulares de los microorganismos debido a la parte hidrofóbica de su estructura química. Esta interacción puede resultar en la fuga de componentes celulares o incluso, en la muerte celular (Yanti et al., 2014), afectando a la estructura granular.

Lu et al. (2015a) evaluaron el rendimiento a largo plazo del tratamiento de un agua residual contaminada con metanol en un reactor UASB. El reactor se inoculó con un fango en suspensión procedente una planta depuradora de aguas residuales municipales, y con fango granular procedente del sistema de tratamiento de un agua residual contaminada con una resina sintética. El sistema operó de manera estable durante 240 días alcanzando una carga orgánica de $48 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ y una producción máxima de metano de $14.4 \pm 4.4 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Posteriormente, se observó la desintegración del fango granular, provocando el lavado de la biomasa y alteraciones en la eficacia de tratamiento. De acuerdo con la evaluación de las características fisicoquímicas del fango anaerobio, estos autores determinaron que la desintegración de los gránulos fue causada por varios factores: la reducción en la producción de EPS y el desequilibrio en la composición de proteínas y polisacáridos en las EPS, una limitación en la precipitación de calcio para la formación de núcleos inertes e interacciones débiles entre el calcio y las EPS debido a la insuficiencia de este catión en el afluente, y la simplificación de la diversidad de microorganismos en el fango debido a su aclimatación al metanol como única fuente de carbono. Estos resultados son consistentes con otros estudios en los que se ha demostrado que el cambio en la composición de la fuente de carbono del agua residual causa un cambio gradual en las características estructurales de los gránulos, la estructura microbiana y las características de sedimentación de los agregados, pudiendo ocasionar su ruptura (Hulshoff Pol, 1989; Leitão, 2004; Yang y Anderson, 1994).

En el estudio conducido por Lafita et al. (2015) se observó que el aporte intermitente de sustrato orgánico (16 horas al día, 5 días de la semana) con una carga orgánica volumétrica de $35 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ lecho d}^{-1}$ condujo a la desintegración parcial del fango anaerobio en reactores EGSB alimentados con etanol y 1-metoxi-2-propanol en una relación másica 4:1 a temperaturas de 18 y 25 °C. La desintegración de los gránulos produjo la reducción de la eficacia de eliminación de la materia orgánica y del rendimiento de metano de los sistemas de tratamiento. Ding et al.

(2015) sugirieron que la desintegración de los gránulos podría ocurrir en condiciones en las que se limita el sustrato para facilitar el acceso a los microorganismos situados al interior de los agregados. Este es un aspecto a destacar que justifica el estudio de la formación y la estabilidad de la biomasa granular en reactores anaerobios aplicados al tratamiento de disolventes orgánicos de interés industrial, considerando que la robustez del proceso depende de la adaptabilidad de los microorganismos a condiciones variables, y de la supervivencia o el mantenimiento de las poblaciones individuales durante la interrupción del suministro del agua residual (O'Flaherty et al., 1997).

Sin embargo, es importante destacar que otros autores no han observado inconvenientes relacionados con el deterioro o la desintegración del fango anaerobio en reactores de lecho granular aplicados al tratamiento de disolventes orgánicos (Bravo et al., 2017; Oktem et al., 2007). De modo que la desintegración puede estar relacionada, bien con la naturaleza de los disolventes orgánicos tratados, con las condiciones ambientales u operacionales, o con la configuración del reactor de lecho granular empleado. Todo ello pone de manifiesto la necesidad de estudiar la formación de biomasa granular con este tipo de sustratos, evaluando de manera integral aspectos operacionales y parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la biomasa anaerobia, que permitan discernir los factores principales que inciden en el proceso y procurar la evaluación de estrategias para evitar la desintegración del fango que, en definitiva, ocasiona el deterioro de la eficacia de tratamiento y de la producción de biogás.

3 OBJETIVOS

La presente tesis doctoral se enmarca en la línea de investigación del grupo GI²AM correspondiente a la optimización del proceso de tratamiento anaerobio de emisiones industriales de disolventes orgánicos. El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar la formación y la evolución de biomasa granular en reactores anaerobios de alta carga a escala de laboratorio empleados para el tratamiento de un agua residual sintética contaminada con disolventes orgánicos oxigenados de alta solubilidad en agua, concretamente etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, e inoculados con un fango anaerobio en suspensión. En este estudio se pretende establecer una estrategia para la obtención y la retención de biomasa granular a partir de fangos en suspensión, a fin de determinar la viabilidad de sustituir el uso de fango granular en la puesta en marcha del sistema de biolavador anaerobio. Para la consecución de este objetivo general se han desarrollado cuatro líneas de trabajo, cada una de ellas con objetivos específicos:

1. Estudio de la **formación de biomasa granular en condiciones de alimentación en continuo** de un agua residual contaminada con los disolventes orgánicos de interés.

Los objetivos específicos de este estudio incluyen:

- Evaluar el efecto de la adición del polímero quitosano en la formación de biomasa granular a partir de un fango en suspensión.
- Determinar el efecto de la adición de quitosano sobre el tiempo requerido para la puesta en marcha de reactores UASB.
- Evaluar las características fisicoquímicas y bioquímicas del fango granular formado y su relación con las condiciones de operación.
- Profundizar en la dinámica de las poblaciones microbianas durante el proceso de granulación aplicando técnicas de biología molecular.

2. Estudio de la **operación** de los reactores de lecho granular **bajo condiciones de alimentación intermitente**, con el fin de:

- Determinar la capacidad de tratamiento de reactores de lecho granular operando bajo condiciones de suministro intermitente de sustrato orgánico de acuerdo con la operación habitual en instalaciones a nivel industrial: 16 horas al día durante 5 días a la semana.

- Analizar la respuesta transitoria de los sistemas tras la reanudación del suministro de sustrato y evaluar la influencia de la duración de la interrupción sobre el rendimiento del proceso.
 - Evaluar el efecto de las perturbaciones en la retención y en las características fisicoquímicas y bioquímicas del fango granular.
 - Evaluar el efecto de la alimentación intermitente sobre la estructura de las comunidades microbianas predominantes.
3. Estudio de la **formación de biomasa granular en condiciones de alimentación intermitente** de un agua residual contaminada con los disolventes orgánicos de interés.

Los objetivos específicos de este estudio se han concretado en:

- Evaluar la puesta en marcha y la formación de biomasa granular a partir de un fango en suspensión bajo alimentación intermitente de sustrato orgánico en presencia de quitosano.
 - Analizar el efecto de la carga hidráulica sobre la formación de biomasa granular.
 - Valorar la respuesta transitoria de los sistemas durante el proceso de granulación.
 - Determinar la influencia de la alimentación intermitente sobre las características del fango granular formado.
 - Comparar la estructura de las comunidades microbianas del fango granular desarrollado en los diferentes experimentos realizados con quitosano.
4. Estudio de la **formación de biomasa granular en presencia de esferas de alcohol polivinílico (PVA)**, con el fin de:
- Evaluar la adición de esferas de PVA como alternativa para favorecer la puesta en marcha y la formación de biomasa granular en un reactor UASB con alimentación continua de un agua residual contaminada con los disolventes orgánicos de interés.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

En el capítulo que se presenta a continuación, se describen los equipos, las técnicas analíticas y los procedimientos experimentales empleados en el desarrollo de la presente tesis doctoral.

4.1 MONTAJE EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron en tres reactores de flujo ascendente fabricados en PVC. Los reactores constan de dos secciones ensamblables. La primera sección corresponde a una columna de 6.5 cm de diámetro interno y 120 cm de altura con cuatro puertos equidistantes 25 cm para la toma de muestras, y una estructura cónica en la parte superior de 20 cm de diámetro mayor, 6.5 cm de diámetro menor y 35 cm de altura. Sobre esta estructura cónica se ubica la segunda sección correspondiente a la zona de sedimentación, en la que se sitúa el separador gas-líquido-sólido (GLS). Esta zona puede presentar dos configuraciones: una con un diámetro interno de 20 cm y una altura de 24 cm, y otra con una altura de 12 cm y de mismo diámetro. De este modo, de acuerdo con la configuración de la zona de sedimentación, los reactores pueden operarse con un volumen efectivo de 7.8 L o de 4.5 L. En las Figuras 4.1 y 4.2 se ilustran ambas configuraciones de reactor.

Tal como se ilustra en las Figuras 4.1 y 4.2, la corriente de entrada a cada reactor se suministró desde el tanque de alimentación que contenía agua, nutrientes y bicarbonato de sodio. El agua residual sintética se preparó in-situ de forma continua mediante la inyección de una mezcla de disolventes orgánicos en la corriente de entrada de cada reactor. La mezcla la componían los disolventes etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol en relación másica 7:2:1. La inyección de la mezcla de disolventes se realizó utilizando, para cada reactor, una bomba de jeringa NE 1000 (New Era Pump Systems Inc., EE.UU.). Las acciones de suministro y de recarga de la jeringa se realizaron de forma automática dotando al sistema de un dispositivo para la inversión del recorrido del émbolo de la jeringa y de una válvula de tres vías accionada neumáticamente. De esta forma, se realizaba la succión de la mezcla ternaria desde una botella sellada para efectuar el llenado de la jeringa y su posterior inyección en la conducción de entrada del reactor. La automatización de la alimentación de disolventes permitió la adición constante e ininterrumpida de sustrato orgánico en los experimentos que se llevaron a cabo bajo condiciones de alimentación continua, así como la programación de interrupciones en los experimentos que se realizaron bajo condiciones de alimentación intermitente de sustrato orgánico.

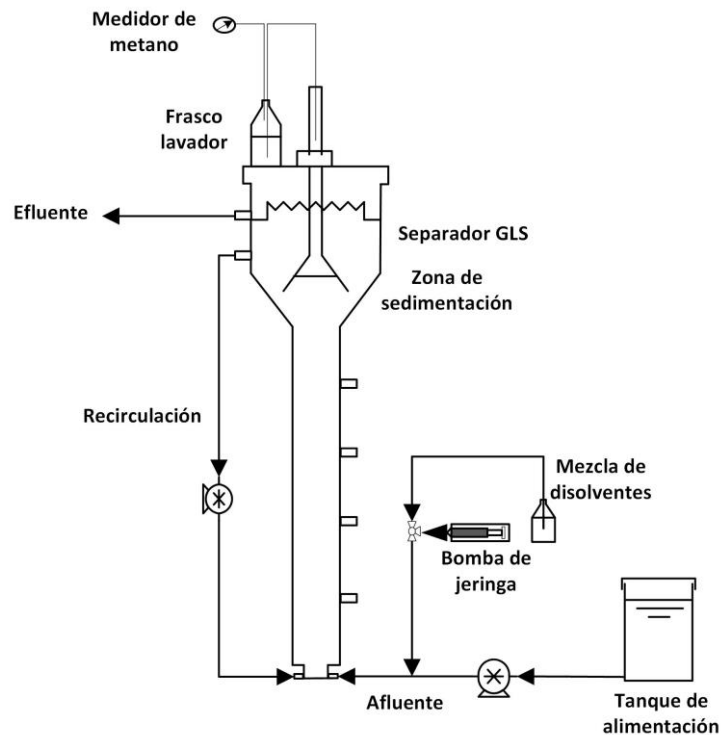


Figura 4.1. Esquema del montaje experimental a escala de laboratorio de la configuración de reactor con un volumen de 7.8 L.

La velocidad ascensional del líquido en el lecho se ajustó, en su caso, mediante la recirculación de una corriente obtenida desde un puerto ubicado en la zona de sedimentación. El biogás recolectado en el separador GLS se hizo pasar por un frasco lavador situado en la sección superior de cada reactor, el cual contenía una solución de NaOH (3 M) para absorber el CO_2 y el H_2S , previa conducción al medidor de flujo (Ritter TG 05, Alemania). Los caudales correspondientes a las corrientes de entrada y de recirculación de los reactores se ajustaron mediante bombas peristálticas (Watson-Marlow, EE.UU.). Para la distribución uniforme del afluente se utilizó un tubo de PVC con diversos orificios ubicado en el fondo de cada reactor y un lecho de 15 cm de altura de esferas de vidrio de 16 mm de diámetro. Los reactores se operaron a temperatura ambiente con valores en el intervalo comprendido entre 22 y 26 °C durante todo el periodo de la experimentación.

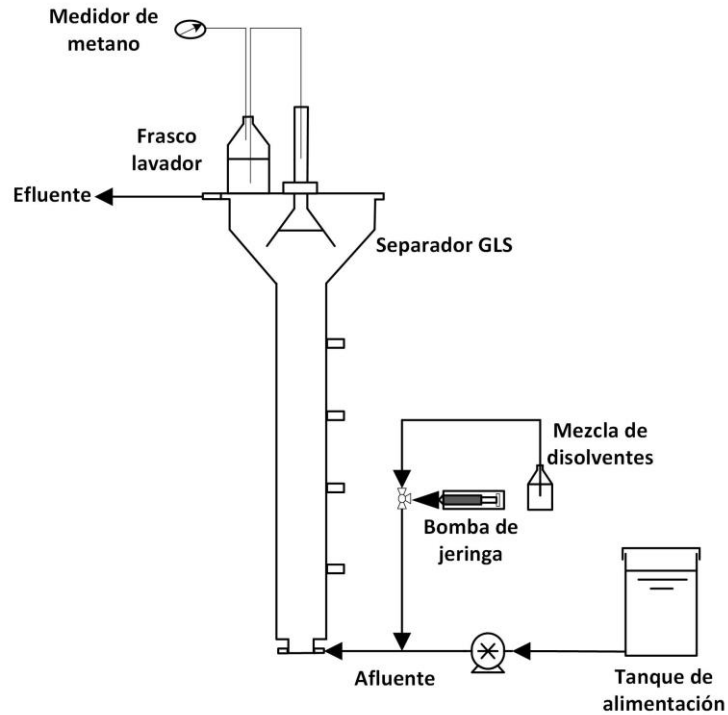


Figura 4.2. Esquema del montaje experimental a escala de laboratorio de la configuración de reactor con un volumen de 4.5 L.

4.2 INÓCULO

Los reactores se inocularon con fango anaerobio en suspensión procedente del digestor de la estación depuradora de aguas residuales Quart-Benager ubicada en el área metropolitana de la ciudad de Valencia. En esta estación depuradora se tratan aguas residuales de origen doméstico y agroindustrial. Durante el desarrollo de la tesis doctoral se emplearon dos muestras de fango anaerobio en suspensión. Las muestras de fango fueron tomadas con una diferencia temporal de 19 meses. Las características fisicoquímicas de ambos inóculos se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Características fisicoquímicas del fango inóculo.

Parámetro	Inóculo I	Inóculo II
SST (mg L ⁻¹)	24.6	17.8
SSV (mg L ⁻¹)	15.5	9.9
pH	7.64	7.69
Conductividad (mS cm ⁻¹)	9.38	7.68
Alcalinidad (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	5126.7	3457.1
IVF (mL g SST ⁻¹)	146.3	112.6
Tamaño medio de partícula (μm)	63.7	85.3
AME (NmL CH ₄ g SSV ⁻¹ d ⁻¹)	8 ± 1	48 ± 1

SST: sólidos suspendidos totales; SSV: sólidos suspendidos volátiles; AME: actividad metanogénica específica para la mezcla de disolventes: etanol, acetato de etilo y E2P en relación másica 7:2:1.

4.3 COMPOSICIÓN DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA

Los reactores anaerobios se alimentaron con un agua residual sintética compuesta por disolventes orgánicos, macronutrientes, micronutrientes y bicarbonato de sodio para suministrar la alcalinidad necesaria. Los disolventes orgánicos de interés en esta tesis doctoral son los constituyentes principales de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles provenientes de la industria flexográfica (Bravo, 2017): etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol en relación másica 7:2:1. En la Tabla 4.2 se muestran las propiedades físicas de los disolventes orgánicos. La concentración de los disolventes en la corriente de entrada de cada reactor se ajustó modificando el caudal de la bomba de inyección, y fue variable de conformidad con la carga orgánica aplicada en los experimentos realizados. Los macronutrientes nitrógeno y fósforo se añadieron en una relación DQO:N:P de 300:2:1 y los micronutrientes se dosificaron según la composición sugerida por Lafita et al. (2016). En la Tabla 4.3 se presenta la dosificación de macronutrientes y micronutrientes en la corriente de entrada de los reactores en función de la DQO alimentada. El agua residual sintética se preparó con agua desionizada y con agua de la red de suministro en una proporción 9:1. El agua de red se empleó para aportar el contenido de sulfatos al medio en una concentración próxima a 30 mg SO₄⁻² L⁻¹.

Para favorecer la formación de gránulos se suministraron los cationes divalentes calcio y magnesio para mantener unas concentraciones de 150 y 40 mg L⁻¹,

respectivamente, en la corriente de entrada de los reactores, valores en los intervalos que sugieren Yu et al. (2001b) y Singh et al. (1999). La alcalinidad se ajustó mediante la adición de NaHCO_3 en concentraciones entre 4 y 5 g L^{-1} para mantener el pH de los reactores en un valor cercano a la neutralidad y un porcentaje de CO_2 en el biogás entre 30 y 35 % a la temperatura de trabajo (Tchobanoglous et al., 2003).

Tabla 4.2. Propiedades físicas de los disolventes utilizados durante la ejecución de los experimentos.

Propiedad	Etanol	Acetato de etilo	1-etoxi-2-propanol
Fórmula química	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_2$
Número CAS	64-17-5	141-78-6	1569-02-4
Peso molecular (g mol^{-1})	46.07	88.11	104.15
Punto de ebullición a 1 atm ($^{\circ}\text{C}$)	78.32	77.10	132.00
Densidad del líquido ¹ (kg m^{-3})	789.3	897.0	896.0
Presión de vapor a 20 $^{\circ}\text{C}$ (kPa)	5.80	9.20	0.65
Solubilidad en agua a 20 $^{\circ}\text{C}$ (g L^{-1})	Miscible	83	Muy soluble
Punto de inflamación ($^{\circ}\text{C}$)	13	7	42
Temperatura de autoignición ($^{\circ}\text{C}$)	363	427	255
Límites de explosividad (% vol)	3.3-19.0	2.2-11.5	1.3-12.0

¹En condiciones normales.

Tabla 4.3. Composición de nutrientes en el afluente de los reactores anaerobios.

Macronutrientes	mg g DQO^{-1}	Micronutrientes	mg g DQO^{-1}
NH_4Cl	25.5	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.42
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	14.2	H_3BO_3	0.11
KCl	2.4	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
Extracto de levadura	7.5	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.14
Compuesto	mg L^{-1}	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.06
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	334.50	Al_2O_3	0.06
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	550.19	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.16
		$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.04
		EDTANa ₂	0.1

4.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL CONTROL Y EL SEGUIMIENTO DE LOS REACTORES

Durante la ejecución de los experimentos se realizó el seguimiento de los reactores anaerobios mediante la evaluación de los parámetros de control: pH, alcalinidad, ácidos grasos volátiles (AGV) y conductividad; la pérdida de sólidos en el efluente; el rendimiento en cuanto a la eliminación de la materia orgánica y la producción de biogás, así como la formación de biomasa granular. El rendimiento de los sistemas se determinó mediante la caracterización de la materia orgánica del efluente, evaluando la DQO soluble y la composición de los disolventes orgánicos y, mediante la medición de la producción de biogás. También se realizaron mediciones de la composición del biogás producido, de la concentración de carbono orgánico en las muestras del efluente de los reactores y de la concentración de nutrientes. Este último parámetro se determinó a fin de verificar la adecuada adición de los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Para el seguimiento de la formación de biomasa granular se determinaron las características fisicoquímicas del fango y su variación temporal. Se analizó la distribución de tamaño de partícula y la producción de sustancias poliméricas extracelulares, la velocidad de sedimentación, la resistencia de los gránulos y la actividad metanogénica específica. En las siguientes secciones se describen las técnicas analíticas y los equipos utilizados para la determinación de los parámetros mencionados. En los capítulos correspondientes a cada estudio realizado se presentan los parámetros evaluados para el seguimiento de la operación de los reactores y para el seguimiento de la evolución de la formación de biomasa granular, a la vez que se indica la periodicidad de su determinación.

4.4.1 pH, temperatura y conductividad

Para la medición de los parámetros pH, temperatura y conductividad se utilizó un sensor multiparamétrico (pH/Cond 340i, WTW, Alemania).

4.4.2 Concentración de ácidos grasos volátiles y alcalinidad

La concentración de AGV y la alcalinidad se determinaron de acuerdo con el método de valoración ácido-base de 5 puntos descrito por Moosbrugger et al.

(1992). El método se fundamenta en el equilibrio químico de las especies involucradas; los AGV de cadena corta se agrupan para formar un único sistema ácido-débil con una constante de equilibrio, ya que todos ellos tienen valores de pK_a muy próximos entre sí (Lahav y Loewenthal, 2000). La valoración se realizó de manera automática utilizando un equipo Titrino Plus 848 (Metrohm, Suiza), previa centrifugación de las muestras a 5000 rpm durante 9 minutos. El equipo realiza la medición del pH inicial de la muestra y determina el volumen de HCl (0.1 M) necesario para obtener los valores de pH de 6.7, 5.9, 5.2, y 4.3. La alcalinidad y la concentración de AGV se determinan mediante el ajuste de los volúmenes obtenidos a la curva teórica de valoración, utilizando el programa informático Valora (Sánchez et al., 2007) y considerando la conductividad de la muestra. La concentración de AGV representa los ácidos de cadena corta presentes en la muestra líquida expresados en mg de $CH_3COOH L^{-1}$. En esta tesis doctoral, la notación de dicha concentración se ha simplificado como $mg L^{-1}$ para facilitar la lectura de los capítulos que corresponden a los resultados.

4.4.3 Demanda química de oxígeno, carbono orgánico total y carbono inorgánico

La demanda química de oxígeno (DQO), el carbono orgánico total (COT) y el carbono inorgánico (CI) se determinaron en la fracción soluble de las muestras de interés previa filtración a través de filtros de $0.22 \mu m$. La DQO se determinó mediante el método colorimétrico de reflujo cerrado que se describe en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (5220D; APHA, 2005). La curva de calibración del método se realizó al menos cada dos semanas para la medición en el intervalo de concentración entre 0 y $125 mg O_2 L^{-1}$. Para el análisis del carbono total y del carbono inorgánico se utilizó un analizador de carbono para muestras líquidas Total Organic Carbon Analyzer TOC-VCHS (Shimadzu Corporation, Japón). El carbono orgánico total se obtiene por diferencia entre el carbono total y el carbono inorgánico. El calibrado del analizador de carbono se realizó cada dos semanas con disoluciones patrón de hidrógeno ftalato potásico para la determinación del carbono total, y de carbonato y bicarbonato de sodio para la determinación del carbono inorgánico. El calibrado del equipo se efectuó para un intervalo de concentraciones entre 0 y $100 mg C L^{-1}$.

4.4.4 Concentración de disolventes orgánicos

La concentración de disolventes orgánicos de las muestras, previamente filtradas a través de filtros de 0.22 μm , se analizó en un cromatógrafo de gases (Agilent GC 7890A, España) equipado con un detector de ionización de llama y una columna Restek Rtx-VMS (30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 1.4 μm de espesor de película), con helio como gas portador con un caudal de 1.3 mL min^{-1} . El volumen de inyección fue de 2 μL con un split 1:30. Las temperaturas del inyector y del detector se establecieron en 190 y 240 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. El programa de temperaturas en el horno se estableció de la siguiente manera: se mantuvo una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 14 minutos y posteriormente se realizó una rampa con una velocidad de calentamiento de 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar 110 $^{\circ}\text{C}$; esta temperatura se mantuvo durante 3 min. El calibrado del cromatógrafo se realizó mediante la dilución de patrones estándar de los disolventes etanol, acetato de etilo, 1-etoxi-2-propanol, acetona e isopropanol en un intervalo de concentraciones entre 0 y 6 g L^{-1} .

4.4.5 Contenido de sólidos

El contenido de sólidos totales, sólidos suspendidos totales y las fracciones volátiles de las muestras del efluente de los reactores y de las muestras de fango anaerobio, se determinó de acuerdo con los métodos 2540B, 2540D y 2540E que establece el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

Sólidos totales

El contenido de sólidos totales (ST) se determinó mediante la eliminación de la humedad de una muestra al someterla a una temperatura de 105 $^{\circ}\text{C}$ durante al menos dos horas. La pérdida de peso de los ST después de su calcinación a una temperatura de 550 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas representa los sólidos volátiles totales (SV).

Sólidos suspendidos

El contenido de sólidos suspendidos totales (SST) y de sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinó mediante la aplicación del método descrito para el análisis de sólidos totales, previa filtración de la muestra a través de un filtro de 1.0 μm .

4.4.6 Concentración de nutrientes

La concentración de los nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio) de las muestras del afluente y del efluente de los reactores, previa filtración a través de filtros de 0.22 μm , se determinó mediante cromatografía iónica empleando un cromatógrafo iónico 883 Basic IC plus (Metrohm, Suiza) con detección conductimétrica. Se analizaron los cationes sodio, amonio, potasio, calcio y magnesio mediante una columna Metrosep C4-250/4.0 (250 mm de largo y 4 mm diámetro interno), utilizando como eluyente una solución de ácido nítrico (1.7 mM) y ácido dipicolínico (0.7 mM). Para el análisis de los aniones cloruro, nitrato, fosfato y sulfato se utilizó supresión química y una columna Metrosep A Supp3 (250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno), con una solución compuesta por bicarbonato de sodio (1.7 mM) y carbonato de sodio (1.8 mM) como eluyente. Ambas columnas de cromatografía fueron suministradas por Metrohm (Suiza). El equipo se calibró cada doce semanas mediante multipatrones preparados a partir de disoluciones estándares comerciales de 1000 mg L⁻¹ de cada uno de los cationes y aniones de interés.

4.4.7 Producción de metano y composición del biogás

El caudal volumétrico de metano producido en cada reactor se determinó con un medidor de biogás MilliGascounter (Ritter TG 05, Alemania) equipado con una celda de 20 mL. En algunos experimentos se utilizó el dispositivo de medición de flujo del Automatic Methane Potential Test System AMPTS II (Bioprocess Control, Suecia), equipado con 15 celdas individuales de 10 mL. La medición de la producción de metano se efectuó al conectar el medidor a la salida del frasco lavador que contenía la solución de NaOH (3 M) para la absorción del CO₂ y del H₂S del biogás producido.

La composición de CO₂ y CH₄ en el biogás producido se analizó con un cromatógrafo de gases (Agilent GC 7890A, España) equipado con un detector de conductividad térmica. Una muestra de 0.5 mL de biogás se inyectó en el cromatógrafo para su separación en dos columnas conectadas en serie: HP-Plot/U (30 m de largo, 0.32 mm de diámetro interno y 10 μm de espesor de película) y HP-Moliseve (30 m de largo, 0.32 mm de diámetro interno y 12 μm de espesor de película). Como gas portador se utilizó helio con un caudal de 4.2 mL min⁻¹ y un split 1:5. Las temperaturas del inyector, el horno y el detector se establecieron en 200, 40 y 250 °C, respectivamente. El calibrado del equipo se realizó como describe Henares (2017).

El contenido en sulfuro de hidrógeno del biogás se determinó con un medidor portátil equipado con analizadores ópticos infrarrojos y celdas electroquímicas de larga duración Combimass GA-m (Binder, Alemania). Para ello, el biogás de la salida del separador GLS se recolectó en bolsas de muestreo de cuatro capas metálicas no permeables al metano de 1 L de capacidad FlexFoil® (SKC, EE.UU.).

4.4.8 Determinación de la concentración de metano disuelto

La concentración de metano disuelto se determinó mediante el método de espacio de cabeza. Para ello, se tomaron muestras de 50 mL del puerto de recirculación de los reactores y se inyectaron en botellas ámbar selladas de 125 mL, cuyo contenido de aire fue desplazado previamente con helio. Los viales se agitaron manualmente durante 30 segundos y, posteriormente, a 120 rpm a una temperatura de 25 °C en un agitador orbital (G25-KC, New Brunswick Scientific, EE.UU.) durante 3 horas para permitir el equilibrio entre las fases líquida y gaseosa. Tras alcanzarse el equilibrio, una muestra de 0.5 mL de gas del espacio de cabeza se analizó de acuerdo con el método cromatográfico descrito en la sección 4.4.7. La concentración de metano disuelto se determinó mediante la siguiente expresión:

$$C_L = \frac{C_G(HV_G + V_L)}{HV_L} \quad (4.1)$$

donde, C_L es la concentración de metano en la fase líquida (mg L⁻¹), C_G es la concentración de metano en el espacio de cabeza después del equilibrio y se

obtiene mediante el análisis cromatográfico (mg L^{-1}), V_L y V_G corresponden al volumen de líquido y de gas en la botella, respectivamente (mL), y H es la constante adimensional de la Ley de Henry, 29.55 para el metano a 25 °C (Sander, 1999). El volumen de líquido (V_L) se calculó por medición del peso del vial antes y después de la inyección de la muestra líquida. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado.

4.4.9 Características fisicoquímicas y bioquímicas del fango granular

El seguimiento del proceso de granulación se evaluó de acuerdo con el análisis de las siguientes características fisicoquímicas del fango anaerobio: la distribución de tamaño de partícula, la producción de sustancias poliméricas extracelulares, la velocidad de sedimentación, la resistencia, la actividad metanogénica específica y la morfología de los gránulos formados. Las muestras de fango para la realización de los análisis se tomaron del puerto inferior de los reactores. En el plan de trabajo de cada experimento se describen las características del fango anaerobio evaluadas y su periodicidad. En los siguientes apartados se describen los métodos y equipos que se emplearon para determinar las características del fango granular.

Distribución de tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula se determinó por difracción láser utilizando el equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Reino Unido), el cual tiene un intervalo de detección de 0.02 a 2.00 mm. La técnica de medición de tamaño de partícula por difracción láser se fundamenta en la medida de la intensidad de la luz dispersada cuando un haz de luz láser pasa a través de la muestra. El resultado obtenido 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.

Con el propósito de determinar la cantidad de partículas con un diámetro superior a 2.0 mm, se tomó una muestra de fango de 15 mL y se tamizó utilizando un tamiz de paso de luz de 2.0 mm. El tamiz se lavó con agua destilada para recuperar el fango depositado. Se determinaron los SST del residuo resultante del lavado del tamiz y de la biomasa filtrada por el mismo (con un tamaño inferior a

2.00 mm) para estimar el porcentaje en masa de SST con un tamaño superior a 2.00 mm.

Velocidad de sedimentación

La velocidad de sedimentación del fango anaerobio fue determinada de acuerdo con el método descrito por Ghangrekar et al. (2005) utilizando una columna de PVC de 60 cm de largo y 6 cm de diámetro. Muestras de fango de 25 mL diluidas con agua en un factor 1:5 fueron transferidas a la columna, la cual estaba llena de agua destilada. La cantidad de fango sedimentado en el fondo de la columna se recolectó a intervalos fijos de tiempo: 0.5, 1, 2, 3, 7.5, 15, 30 y 60 minutos. Las muestras recolectadas en cada intervalo fueron examinadas en su contenido de SST. La medida representa la cantidad de fango sedimentado en cada intervalo de tiempo. La velocidad de sedimentación promedio fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\bar{V}_s = \frac{\sum(\text{SST en cada intervalo}) \times (V \text{ de sedimentación en cada intervalo})}{\text{SST de la muestra}} \quad (4.2)$$

Extracción y cuantificación de sustancias poliméricas extracelulares

La extracción de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) del fango anaerobio se llevó a cabo de acuerdo con el método propuesto por Frølund et al. (1996), modificado por D'Abzac (2010). Muestras de fango de 50 mL se llevaron a sonicación en un baño de ultrasonidos (Branson MT-1510 EE.UU.) a 42 kHz durante 1 min. A continuación, se añadieron 70 g de resina de intercambio catiónico por g SSV⁻¹ (CER, Dowex Marathon 20–50 mallas, forma Na⁺, Sigma-Aldrich, España); las muestras se dejaron en agitación a 600 rpm a una temperatura de 4 °C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 30 minutos a 15000 g. El contenido de proteínas y de polisacáridos en el sobrenadante, considerados los componentes principales de las EPS (Liu et al., 2010), representa las EPS extraídas. El contenido de proteínas y de polisacáridos se determinó previa filtración de las muestras por filtros de 0.45 µm. El análisis de proteínas se llevó a cabo según el método colorimétrico de Lowry et al. (1951) usando un kit comercial TP0300 (Sigma-Aldrich, España) con albúmina de suero de bovino como patrón

estándar. El contenido en polisacáridos se determinó con el método de fenol-ácido sulfúrico propuesto por Dubois et al. (1956) con glucosa como patrón estándar.

Para las muestras correspondientes al experimento de operación de los reactores con alimentación intermitente de agua residual, las EPS también se determinaron en el licor de mezcla, es decir, en la fracción soluble de la mezcla de fango anaerobio y agua del lecho de reacción. Para ello, una muestra de 50 mL se centrifugó a 4 °C durante 15 minutos a 8000 g. El sobrenadante se retiró y se filtró por filtros de 0.45 µm para el análisis de proteínas y carbohidratos; mientras que el pellet se resuspendió hasta el volumen original de la muestra añadiendo una solución tampón de pH 7.0 (Na₃PO₄ 2 mM; NaH₂PO₄ 4 mM; NaCl 9 mM; KCl mM) para proceder a la extracción de las EPS del fango empleando el método de sonicación y adición de resina de intercambio iónico descrito anteriormente.

Resistencia de los gránulos

El coeficiente de integridad sugerido por Ghangrekar et al. (1996) se ha empleado en la bibliografía como parámetro indicativo de la resistencia del fango granular a la desintegración causada por las fuerzas de cizalladura dentro del reactor (Show et al., 2004). Si bien el coeficiente de integridad no determina la resistencia exacta de los gránulos, indica de manera general su resistencia a las fuerzas de cizalladura a las que se someten en condiciones de flujo dinámico durante la operación del reactor. Un valor alto del coeficiente de integridad corresponde a gránulos más resistentes (Sudmalis et al., 2018). La resistencia de los gránulos se determinó según el método descrito por Xiao et al. (2008). Una muestra de 5 mL de fango granular se depositó en tubos de centrifuga de 50 mL y se diluyó hasta un volumen de 30 mL con el agua residual sintética del afluente de los sistemas. La mezcla fue agitada en un vortex (IKA MS2, España) a 2500 rpm durante periodos de 2, 3 y 5 minutos. Después de cada periodo de agitación, el fango granular se dejó sedimentar durante 1 min; el sobrenadante se decantó para cuantificar la cantidad de finos producidos como SST, mientras que el fango granular restante se diluyó de nuevo hasta 30 mL para la siguiente agitación. El coeficiente de integridad en cada periodo Cl_t se calculó como:

$$Cl_t = \left(1 - \frac{SST_t}{SST_i} \right) \times 100\% \quad (4.3)$$

donde, SST_i representa la cantidad de sólidos suspendidos totales de la muestra inicial y SST_t la cantidad de sólidos después de t minutos de esfuerzo cortante producido en el vortex.

Actividad metanogénica específica y potencial bioquímico de metano

Los ensayos de actividad metanogénica específica (AME) y potencial bioquímico de metano (PBM) se realizaron para determinar la biodegradabilidad de los disolventes orgánicos de interés y para evaluar la calidad del fango anaerobio en cuanto a la producción de metano. Este análisis se realizó para el inóculo y para el fango obtenido al finalizar cada experimento de granulación. Para ello, se utilizó un Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II, Bioprocess Control, Suecia). Los ensayos se llevaron a cabo en reactores de 500 mL agitados de manera intermitente (60 s de agitación/60 s sin agitación) a 112 rpm y a una temperatura de 25 °C controlada mediante un baño termostático. La biomasa y el sustrato se añadieron en una relación de 2.0 g SSV g DQO⁻¹ o de 2.5 g SSV g DQO⁻¹. El sustrato consistió en la mezcla ternaria de etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol en relación másica 7:2:1. La concentración de sustrato en los reactores fue de 2.5 o de 3.0 g DQO L⁻¹. En los ensayos realizados con el fango obtenido al finalizar cada experimento de granulación, se determinó también la biodegradabilidad de cada componente individual de la mezcla. El medio se suplementó con macro y micronutrientes de acuerdo con las concentraciones especificadas en la Tabla 4.3 y con 3 g L⁻¹ de NaHCO₃ para mantener un pH cercano a la neutralidad. El oxígeno se desplazó con nitrógeno antes de la puesta en marcha del sistema. El biogás producido en cada reactor se condujo a un frasco lavador con una solución de NaOH (3 M) para la absorción del CO₂ y el H₂S previo registro en el dispositivo automático. Los ensayos se realizaron al menos por duplicado según la disponibilidad de fango.

La actividad metanogénica específica se evaluó como la velocidad máxima de producción de metano por la cantidad de biomasa añadida (mL CH₄ g⁻¹ SSV d⁻¹). El potencial bioquímico de metano se estimó a partir del volumen de metano producido por la cantidad de sustrato orgánico aportado (mL CH₄ g⁻¹ DQO).

Morfología del fango granular

La superficie de los gránulos se observó mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello, se utilizó el equipo SEM- S4100 (Hitachi, Japón) que emplea un voltaje de 11 Kv y se encuentra equipado con un cañón de emisión de campo, un detector BSE ATRATA, un sistema de captación de imágenes EMIP 3.0 y un sistema de microanálisis RONTEC. Las muestras de los gránulos se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % y se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de etanol. Posteriormente, las muestras se secaron hasta el punto crítico con CO₂, se fijaron en una placa metálica y, finalmente, se recubrieron con una película fina de oro-paladio. El análisis se realizó en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental de la Universitat de València.

4.5 ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

La identificación y el análisis de las comunidades microbianas de las muestras de fango extraídas en cada experimento, se realizó con el propósito de estudiar la dinámica de la estructura de las poblaciones microbianas durante la operación de los reactores y su relación con la degradación anaerobia de los disolventes orgánicos y con el proceso de granulación. El análisis de las comunidades microbianas se realizó mediante la aplicación de dos técnicas de biología molecular: electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en inglés, denaturing gradient gel electrophoresis) y posterior identificación de las especies mediante la secuenciación del gen ARNr 16S con el método Sanger (Sanger et al., 1977), y la tecnología de secuenciación de alto rendimiento (High-throughput DNA sequencing) Illumina. El procedimiento para la aplicación de cada técnica se describe en las siguientes secciones.

4.5.1 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante se llevó a cabo adaptando el método descrito por Lafita (2016) y modificado por Bravo et al. (2017) cuyas etapas y características se describen a continuación.

Extracción y cuantificación del ADN genómico

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los microorganismos presentes en la biomasa se realizó con un kit comercial para muestras de suelo FastDNA Spin Kit for Soil Isolation (MP Biomedicals, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción se verificó determinando la concentración del ADN mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermoscientific, EE.UU.).

Amplificación del material genético

El ADN extraído en la fase anterior se utilizó para amplificar el gen ARNr 16S de los procariotas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación se llevó a cabo empleando una mezcla de los siguientes reactivos: enzima ADN polimerasa termoestable Ex Taq (Takara, Japón), solución tampón 10X ExTaq buffer (Takara, Japón), sustrato de la enzima dNTPs (Takara, Japón), el ADN extraído, agua estéril y los cebadores correspondientes a la amplificación de arqueas o bacterias. En la Tabla 4.4 se presentan la concentración y el volumen añadido de cada reactivo para la realización de la PCR de arqueas y bacterias. Para la amplificación del ADN de arqueas se utilizaron los cebadores ARC787F-GC, cuya secuencia es 5'-ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC-3', y el ARC1059-R con secuencia 5'-GCC ATG CAC CWC CTC T-3' (IDT, Condalab, España). Para la amplificación del ADN de bacterias se emplearon los cebadores 357F-GC, con secuencia 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' y el 518-R, con secuencia 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3 (Metabion, Grupo Taper, España).

Tabla 4.4. Concentración y cantidad de los reactivos empleados en la PCR para un volumen de reacción de 50 μL .

Reactivo	Concentración inicial	Volumen μL
Taq Buffer	10X	5
dNTPs	2.5 μM	4
Cebador 1	10 μM	1
Cebador 2	10 μM	1
ExTaq Polimerasa	0.15 U μL^{-1}	0.15
Agua	-	36.85
Muestra de ADN	5 ng μL^{-1}	2

dNTPs: deoxinucleótidos trifosfato, deoxyribonucleotides triphosphates por sus siglas en inglés.

La amplificación se realizó en un termociclador (MyGene L Series Peltier Thermal Cycler, Hangzhou Long Gene Scientific Instruments, China). En la Tabla 4.5 se muestran las condiciones en las que se llevó a cabo la PCR para la amplificación de bacterias y de arqueas. El procedimiento se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % preparado en solución de tampón tris-acetato EDTA (TAE 1X), al cual se añadieron 2 μ L de Eurosafe (EuroClone, Italia) para la visualización del ADN amplificado al exponerlo a luz ultravioleta. Una vez solidificado el gel e inmerso en la cubeta de electroforesis (Biocom, Reino Unido), se cargaron en diferentes pocillos 5 μ L del producto de la PCR previamente mezclado con 0.8 μ L de azul de bromofenol. En uno de los pocillos del gel se cargó un patrón de tamaños moleculares o Ladder para verificar la amplificación de las muestras (Sharmass 100, Euroclone, Italia). La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 minutos. Una vez finalizada, el gel se observó en un transiluminador con luz ultravioleta Minibis Pro (DNR Bio-imaging Systems, EE.UU.).

Tabla 4.5. Condiciones para la amplificación del gen 16S del ARNr de arqueas y bacterias.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo min	Ciclos	
			Bacterias	Arqueas
Desnaturalización inicial	94	5	1	1
Desnaturalización	94	1		
Amplificación	Anillamiento	65	19	19
	Elongación	72	1	
Desnaturalización	94	1		
Amplificación	Anillamiento	55	12	16
	Elongación	72	1	
Elongación final	72	10	1	1

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

La técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante se fundamenta en la movilidad de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos, en un gel con condiciones desnaturalizantes. Debido a la variación de la secuencia de nucleótidos, los amplicones del gen ARNr 16S —resultantes de la PCR— de diversas especies de una mezcla microbiana

heterogénea pueden separarse. Para la separación de los fragmentos de ADN se utiliza un gradiente lineal creciente de una mezcla de agentes químicos desnaturalizantes (como formamida y urea) que se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante el análisis se mantiene una temperatura constante y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una concentración determinada de la mezcla desnaturalizante a la que las cadenas de ADN se separan, interrumpiendo así su desplazamiento. Las cadenas de ADN se separan a una concentración determinada en función 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). La técnica proporciona un patrón de bandas que representa la diversidad microbiana de la muestra de interés, que posteriormente se identifica mediante secuenciación.

Para la separación de los fragmentos de ADN de los productos de PCR se preparó un gel de poliacrilamida al 8 %. En el experimento correspondiente a la granulación de un fango en suspensión con suministro continuo de sustrato orgánico, se utilizó un gradiente de desnaturalización de 20 a 35 % para los fragmentos de ADN de bacterias; mientras que en los otros experimentos se utilizó un gradiente desnaturalizante de 35 a 50 %. Para los fragmentos de ADN de arqueas se empleó un gradiente desnaturalizante de 40 a 55 % en todos los experimentos realizados. En la Tabla 4.6 se presenta la composición de las soluciones desnaturalizantes de alta y baja concentración.

Tabla 4.6. Composición de los geles de poliacrilamida para el análisis de electroforesis con gradiente desnaturalizante.

Compuesto	CAP	Bacterias			Arqueas	
		20 %	35 %	50 %	40 %	55 %
Agua milli Q (mL)	3.6	9.5	8.5	6.5	7.5	6.0
Acrilamida 40 % (mL)	1.3	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Tampón TAE 50X (mL)	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Urea (g)	-	1.3	1.9	3.1	2.5	3.4
Formamida (mL)	-	1.2	1.8	3.0	2.4	3.3
Glicerol (mL)	-	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
APS ¹ 10 % (μL)	22.5	67.5	67.5	67.5	67.5	15.0
TEMED ² (μL)	10	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0

¹Peroxidisulfato de amonio; ²Tetrametiletilendiamina.

El gel de poliacrilamida se preparó en un sistema de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (VWR International Eurolab, España). Las soluciones de alta y baja concentración se introdujeron al sistema utilizando un generador de gradiente (Hoefer SG 100, EE.UU.). La parte superior del gel se completó con la solución de sellado (CAP), en la cual se dispuso un peine para formar los pocillos en los que se adicionó el producto de la PCR. Tras la polimerización del gel, éste se introdujo en una cubeta de electroforesis KuroGel Verti 2020 DGGE System (VWR International Eurolab, España) con 7 L de tampón TAE 1X y en cada pocillo del gel se adicionaron 20 µL del producto de la PCR con 2.0 µL de azul de bromofenol.

La electroforesis se llevó a cabo a 60 °C aplicando un voltaje de 100 V durante 14 horas. Una vez finalizó, el gel de poliacrilamida se introdujo durante 30 minutos en una cubeta con 400 mL de tampón TAE 1X y 18 µL de Eurosafe para su tinción y posterior visualización. La visualización y captación de imágenes se llevó a cabo el equipo Minibis Pro (DNR Bio-imaging Systems, EE.UU.), equipado con un sistema de adquisición de imágenes. La escisión y extracción de las bandas predominantes del gel de poliacrilamida se realizó sobre un transiluminador UV (ECX-20M, Vilbert Lourmat, España) utilizando un bisturí estéril. Las bandas se disgregaron en microtubos estériles individuales con 30 µL de agua para biología molecular (Sigma Aldrich, España) y se incubaron durante 15 horas a 4 °C para permitir la dilución del material genético. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 10 000 rpm en una microcentrífuga Micro Star 12 (VWR, España) durante 2 min. El sobrenadante resultante se amplificó por PCR de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. El producto de la PCR de las bandas se purificó con un kit comercial High Pure PCR Product Purification (Roche, Suiza) para su posterior secuenciación.

Secuenciación del gen ARNr 16S

La secuenciación del gen ARNr 16S de las bandas amplificadas y purificadas en la etapa anterior 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 fundamenta en la generación de fragmentos de ADN que terminan en una de las cuatro bases nitrogenadas —adenina, guanina, citosina y timina— y que poseen marcadores fluorescentes que emiten a diferentes longitudes de onda en función de la base nitrogenada. Para generar los fragmentos de ADN se utiliza el procedimiento dideoxi de Sanger, procedimiento en el cual 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 incorpora 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 la adición de otro nucleótido, generando fragmentos de ADN de diferente longitud terminados en un dideoxynucleótido marcado por un fluoróforo distinto para cada base nitrogenada. Estos fragmentos se someten a electroforesis capilar en gel de forma que se separan por tamaño las moléculas que difieren en sólo un nucleótido. La emisión de fluorescencia de un color determinado y su detección permite asignar el nombre de la base correspondiente y el orden de las emisiones determina la secuencia del ADN.

Identificación de los microorganismos

La identificación de los microorganismos dominantes en las muestras de interés se realizó a partir de las secuencias obtenidas del gen ARNr 16S. Las secuencias obtenidas se compararon con aquéllas disponibles en la base de datos del NCBI (GenBank) (National Center for Biotechnology Information) usando el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.5.2 Secuenciación de alto rendimiento

Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, denominadas tecnologías de segunda generación (NGS, next-generation sequencing), se agrupan en una serie de métodos y técnicas que permiten la secuenciación masiva de múltiples fragmentos de ADN para determinar una secuencia genética. En el ámbito de la secuenciación microbiana, la aplicación de dichas tecnologías ha permitido caracterizar la diversidad molecular entre poblaciones, efectuar el análisis funcional de bacterias y arqueas bajo diferentes condiciones operacionales y realizar diversos análisis genómicos (Aydin, 2016; Lu y Hu, 2017; Na et al., 2016).

Con el propósito de profundizar en el conocimiento de la estructura de las comunidades microbianas que participan en la degradación anaerobia de una corriente acuosa contaminada con disolventes orgánicos de interés industrial, en el desarrollo de esta tesis doctoral se ha empleado la tecnología de secuenciación de alto rendimiento Illumina. Esta tecnología de secuenciación se caracteriza por el uso de nucleótidos marcados con fluoróforos que bloquean de forma reversible la

elongación de la cadena, en lo que se conoce como secuenciación por síntesis. Cada nucleótido incorpora un grupo 3'-OH químicamente bloqueado, de manera que, en cada ciclo de secuenciación, sólo uno de los cuatro nucleótidos se une de forma complementaria al ADN molde emitiendo una señal luminosa que es captada por un sistema óptico altamente sensible. Los nucleótidos que no se unen se eliminan para permitir la incorporación del siguiente nucleótido en ciclos sucesivos. Este proceso se repite varias veces hasta formar "clusters" o racimos, una agrupación de secuencias idénticas inmovilizadas sobre una superficie sólida (Aydin, 2016).

La secuenciación de alto rendimiento se empleó para analizar la estructura de las comunidades microbianas en los experimentos de granulación con alimentación continua de agua residual, de tratamiento anaerobio de un agua residual con alimentación intermitente de sustrato orgánico, y de formación de biomasa granular con alimentación intermitente de sustrato orgánico. Para efectuar la secuenciación, la región hipervariable V4 del ADN (previamente extraído) se amplificó por PCR usando los cebadores universales 515F (50-GTG CCA GCMGCC GCG GTA A-30) y 806R (50-GGACTA CHV GGGTWT CTA AT-30). La secuenciación se llevó a cabo utilizando un sistema MiSeq (Illumina, EE.UU.). Las secuencias obtenidas de los genes ARNr 16S se procesaron mediante el uso del software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) con una longitud de secuencia de 200 nt y un punto de corte de calidad media de 25nt. La amplificación del material genético, la secuenciación y el análisis bioinformático se realizaron en el Servicio de Genómica de la Universitat de València.

4.6 ENSAYO DE JAR-TEST

La dosis óptima de quitosano para la floculación de los inóculos utilizados en los diferentes experimentos se determinó mediante ensayos de jar-test. En los ensayos se empleó un equipo de floculación Flocumatic 3000914 (J.P. Selecta, España) equipado con un controlador de velocidad de agitación, un temporizador y 6 vasos de precipitado de 1 L. Para el ensayo realizado con el inóculo I, el cual se empleó para el experimento correspondiente a la granulación de un fango en suspensión con suministro continuo de sustrato orgánico, éste se diluyó con agua en un factor 1:4 y se evaluaron concentraciones de quitosano comprendidas en el intervalo entre 1.2 y 9.6 mg g SSV⁻¹. Para el inóculo II, empleado en el experimento de granulación de un fango en suspensión con suministro intermitente de sustrato

orgánico, se realizó una dilución 1:2 y se evaluaron concentraciones de quitosano en el intervalo entre 4.0 y 24.3 mg g SSV⁻¹. Las condiciones que se establecieron para la realización del ensayo fueron: 1.5 minutos de agitación a 190 rpm para permitir la agregación de las partículas en suspensión, 30 minutos de agitación a 25 rpm para propiciar la formación de flóculos y 5 minutos de sedimentación. La dosis óptima del polímero se evaluó atendiendo a la reducción de la turbidez en el sobrenadante de las muestras de cada vaso de precipitado transcurrido el tiempo de sedimentación, y a la disminución del índice volumétrico de fangos. Si bien la eficacia del quitosano como floculante en suspensiones de microorganismos depende, entre otros factores, del pH —siendo más eficaz a pH bajos (Yang et al., 2016)—, los ensayos de floculación se realizaron al pH de los inóculos, ya que se encontraba cercano a la neutralidad y en el intervalo adecuado en el que el proceso de degradación anaerobia tiene lugar.

El quitosano empleado para la ejecución de los ensayos de jar-test, y durante la realización de los experimentos, se adquirió en forma de polvo con un grado de desacetilación entre el 75 % y el 85 % y peso molecular medio (Sigma-Aldrich, España). El polímero se preparó con una concentración del 1 % en solución de ácido acético al 1 %.

4.6.1 Medición de la turbidez

La medición de la turbidez se realizó con un turbidímetro Turbiquant® 1500 IR/1500T (Merck, Alemania). El principio de medida de este equipo es la nefelometría, 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 el equipo utiliza una fuente de luz LED IR (infrarrojo) con una longitud de onda de 860 nm, de conformidad con la norma EN ISO 7027.

4.6.2 Determinación del índice volumétrico de fangos

El índice volumétrico de fangos se evaluó siguiendo el método especificado en la sección 2710D del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). Finalizado el ensayo de jar-test, el contenido de cada vaso de precipitado se dejó en reposo durante 30 minutos en conos de Imhoff de

1 L. A continuación, se determinó el volumen de fango sedimentado, se homogenizó la mezcla y se midió la concentración de sólidos suspendidos. El índice volumétrico de fangos corresponde al volumen (mL) de fango ocupado por cada gramo de sólidos suspendidos después del periodo de sedimentación.

4.7 ELABORACIÓN DE ESFERAS DE ALCOHOL POLIVINÍLICO

La elaboración de esferas de alcohol polivinílico (PVA) se llevó a cabo adaptando el método propuesto por Takei et al. (2011) para la inmovilización de microorganismos a partir de una solución acuosa de PVA (Sigma-Aldrich, España) al 8 % p/v y alginato de sodio (Sigma-Aldrich, España) al 1 %. Esta solución se hizo pasar por una aguja impulsada mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow, EE.UU.), mientras se aplicaba una corriente de aire exterior cuya regulación del caudal permitía formar gotas de diferente tamaño que, de manera inmediata, se recogieron en una solución gelificante compuesta por ácido bórico 0.8 M y cloruro de calcio 0.4 M agitada a 400 rpm. El alginato de sodio se utilizó como un agente auxiliar para la formación de esferas de PVA estables, ya que reacciona con los iones de calcio de la solución gelificante para formar alginato de calcio, reforzando así la estructura de las esferas. Este compuesto, además, evita la aglomeración de las esferas de PVA (Zain et al., 2011). Las esferas permanecieron inmersas en la solución gelificante durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se lavaron con agua destilada y se almacenaron a una temperatura de 4 °C para su uso posterior. El 80 % de las esferas elaboradas presentaron un tamaño superior a 2.0 mm. Durante la ejecución del experimento correspondiente al estudio de las esferas de PVA como portadores de biomasa, se utilizó una segunda solución gelificante para mejorar la estabilidad de las esferas. De este modo, tras formar las esferas por el método descrito anteriormente, éstas se sumergieron en una solución de sulfato de sodio 1 M y se dejaron en agitación a 500 rpm durante 2 horas. Las esferas resultantes se lavaron y se almacenaron a 4 °C para su uso posterior.

5 GRANULACIÓN EN REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN CONTINUA DE UN AGUA RESIDUAL CONTAMINADA CON DISOLVENTES ORGÁNICOS: EFECTO DE LA ADICIÓN DE QUITOSANO

Parte de los resultados presentados en este capítulo se han publicado en:

Torres, K., Álvarez-Hornos., F.J., San-Valero, P., Gabaldón, C., Marzal, P., 2018. Granulation and microbial community dynamics in the chitosan-supplemented anaerobic treatment of wastewater polluted with organic solvents. *Water Res.* **130**, 376-387.

La formación y mantenimiento de biomasa granular durante la puesta en marcha y la operación de reactores anaerobios de lecho granular es de gran interés industrial, ya que la inmovilización de los microorganismos permite la aplicación de altas cargas orgánicas con altas eficacias de eliminación. No obstante, la formación de gránulos no ocurre en el tratamiento de todo tipo de aguas residuales; las características del sustrato pueden afectar la diversidad y la abundancia microbiana, influyendo a su vez en la formación y la estructura de los gránulos. En este contexto, la granulación puede verse limitada cuando se tratan aguas residuales que no contienen sustratos complejos, pero fácilmente hidrolizables, como carbohidratos (Fukuzaki et al., 1995; Lu et al., 2015a; Schmidt y Ahring, 1994). Este sería el caso de las aguas residuales que contienen sustratos de tipo acetogénico y metanogénico como los disolventes de interés en la industria flexográfica. Este hecho, junto con las observaciones de diversos autores acerca de la desintegración de biomasa granular en reactores de alta carga empleados para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos (Henry et al., 1996; Lafita et al., 2015; Lu et al., 2015a; Vermorel et al., 2017), pone de manifiesto la necesidad de estudiar el proceso de granulación con este tipo de sustratos.

Un fango anaerobio en suspensión constituye un inóculo de fácil adquisición para la puesta en marcha de reactores de lecho granular. Sin embargo, el tiempo requerido para la obtención de altas eficacias de eliminación aplicando las cargas orgánicas deseadas puede ser prolongado, debido, fundamentalmente, a la complejidad del proceso de formación de la biomasa granular y al tiempo requerido para la adaptación de los microorganismos a las condiciones de operación del sistema de tratamiento. Por consiguiente, el desarrollo de estrategias y procedimientos que en la práctica permitan disminuir el tiempo requerido para la puesta en marcha de los reactores anaerobios de lecho granular supone un reto para la implementación de esta tecnología, particularmente en sectores industriales que generan aguas residuales de composición específica. En el estudio que se presenta a continuación, se evalúa el efecto de la adición del polímero natural quitosano en la disminución del tiempo requerido para la consecución de gránulos durante la puesta en marcha de reactores UASB empleados para el tratamiento de un agua residual contaminada con disolventes orgánicos de interés industrial, en condiciones de suministro continuo de sustrato orgánico.

El estudio se realizó en tres reactores UASB operados a temperatura ambiente en condiciones de alimentación continua de un agua residual sintética contaminada

con los disolventes etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol en una relación másica 7:2:1, e inoculados con un fango en suspensión. La configuración y las condiciones de operación de cada uno de los tres reactores fueron seleccionadas para efectuar el estudio comparativo de la adición de quitosano en la formación de biomasa granular. Los experimentos se llevaron a cabo en tres fases consecutivas en las que se variaron los parámetros operacionales de carga orgánica volumétrica y velocidad ascensional del líquido, en función de los resultados obtenidos en la fase previa en cuanto al rendimiento de los reactores y a la formación de biomasa granular. Los reactores se inocularon al iniciar la primera fase de operación (Fase I) con un fango anaerobio en suspensión procedente del digestor de una estación depuradora de aguas residuales municipales. En esta fase se aplicaron cargas orgánicas bajas y tiempos de retención hidráulicos prolongados para conseguir la adaptación del inóculo al sustrato orgánico alimentado. El reactor de control, R1 (7.8 L de volumen efectivo), se inoculó sin la adición de quitosano; mientras que los otros dos reactores, R2 (7.8 L de volumen efectivo) y R3 (4.5 L de volumen efectivo), se inocularon con la dosis óptima del polímero, previamente determinada en ensayos de jar-test. En la siguiente fase de operación (Fase II) se incrementó la carga orgánica y se aplicó una segunda dosis del polímero a los reactores R2 y R3. En las Fases I y II los reactores R1 y R2 se operaron con corriente de recirculación, mientras que el reactor R3 se operó sin recirculación. En la tercera fase de operación (Fase III) se eliminó la corriente de recirculación de los reactores R1 y R2, y se realizó el aumento gradual de la carga orgánica de los sistemas hasta alcanzar condiciones de operación estables a $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Durante las tres fases experimentales se realizó el seguimiento de la operación de los reactores y, de manera simultánea, se efectuó la evaluación de las características fisicoquímicas del fango anaerobio y el análisis de las poblaciones microbianas del mismo.

En el capítulo 4, correspondiente a Materiales y Métodos, se describe el montaje empleado para el desarrollo de los experimentos, las características del inóculo, la composición del agua residual sintética de interés y las técnicas analíticas utilizadas.

5.1 PLAN DE TRABAJO

En esta sección se describe el plan de trabajo que se estableció para la realización del estudio de granulación de un fango en suspensión en tres reactores

UASB bajo las condiciones anteriormente mencionadas: alimentación continua del agua residual sintética contaminada con los disolventes de interés, con y sin la adición de dosis únicas de quitosano.

5.1.1 Determinación de la dosis óptima de quitosano

La dosis óptima de quitosano aplicada en la puesta en marcha de los reactores R2 y R3 se determinó mediante un ensayo de jar-test. En este ensayo se evaluó el efecto de dosis crecientes del polímero comprendidas entre 1.2 y 9.0 mg g SSV⁻¹ sobre la floculación del fango en suspensión. La dosis óptima se determinó en función de la reducción de la turbidez del sobrenadante y de la mejora de la sedimentación del fango evaluada mediante el índice volumétrico de fangos.

5.1.2 Puesta en marcha y operación de los reactores UASB

El estudio se inició con la puesta en marcha de los tres reactores UASB. Para ello, se empleó el fango anaerobio en suspensión denominado inóculo I procedente de la estación depuradora de aguas residuales de Quart-Benager. Cada reactor se inoculó con 2.5 L de fango en suspensión. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. En la Tabla 5.1 se presentan las condiciones de operación durante la puesta en marcha y la operación de los reactores UASB.

Tabla 5.1. Condiciones de operación durante la puesta en marcha y la operación de los reactores UASB.

Tiempo (días)	Fase I			Fase II			Fase III		
	(0 - 22)			(23 - 89)			(90 - 219)		
Reactor	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	0.3-0.6	0.3-0.6	0.3-0.6	2.3	2.3	4.0	5-20	5-20	8-20
C _e (g DQO L ⁻¹)	2.3-4.5	2.3-4.5	2.3-4.5	3.0	3.0	3.0	5-7.6	5-7.6	4.0-5.3
TRH (d)	7.8	7.8	7.8	1.3	1.3	0.75	1.0-0.4	1.0-0.4	0.5-0.27
V _a (m h ⁻¹)	1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	0.1	0.1-0.3	0.1-0.3	0.1-0.3
Temperatura (°C)	22.0 ± 1.6			25.0 ± 1.3			24.0 ± 1.4		

CO: carga orgánica volumétrica: caudal de sustrato alimentado (kg DQO d⁻¹) por unidad de volumen efectivo de reactor; C_e: concentración de entrada; V_a: velocidad ascensional del líquido; TRH: tiempo de retención hidráulico.

La primera dosis de quitosano se aplicó a los reactores R2 y R3 durante la inoculación. La baja actividad metanogénica específica del inóculo para la degradación de la mezcla de etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol ($8 \pm 1 \text{ NmL CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$) indicó la necesidad de aplicar cargas orgánicas bajas durante la primera fase de operación. En esta fase (Fase I, días 0-22), considerada el período de adaptación para la degradación de los disolventes orgánicos, se aplicaron cargas orgánicas volumétricas entre 0.3 y 0.6 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ y un tiempo de retención hidráulico de 7.8 días. En la siguiente fase (Fase II, días 23-89) se aplicó una segunda dosis del polímero a los reactores R2 y R3, y se incrementó la carga a 18 kg DQO d^{-1} , correspondiente a una carga orgánica volumétrica de 2.3 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para los reactores R1 y R2, y de 4.0 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para el reactor R3. En la Fase III (días 90-219) se efectuó el aumento gradual de la carga orgánica en cada reactor de manera independiente, según su respuesta al incremento de carga aplicado y a la consecución de condiciones de rendimiento estable. El criterio de estabilidad se estableció en variaciones de menos del 5 % en la eficacia de eliminación de la materia orgánica por un periodo de al menos tres veces el tiempo de retención hidráulico, y concentraciones de ácidos grasos volátiles en el efluente de los reactores inferiores a 150 mg L^{-1} . La carga orgánica se incrementó disminuyendo el tiempo de retención hidráulico y/o incrementado el caudal de alimentación de disolventes para aumentar la concentración de sustrato orgánico en la corriente de entrada a los reactores. El experimento finalizó al alcanzar condiciones de operación estables en los tres reactores con una carga orgánica de 20 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Durante la realización del estudio la concentración de materia orgánica en el afluente de los reactores R1 y R2 varió en el intervalo comprendido entre 2.3 y 7.6 g DQO L^{-1} , y entre 2.3 y 5.3 g DQO L^{-1} en el afluente del reactor R3.

Con el fin de propiciar el lavado de partículas finas no aptas para la formación de biomasa granular, durante las Fases I y II los reactores R1 y R2 operaron con una corriente de recirculación cuyo caudal se ajustó para fijar una velocidad ascensional del líquido en el lecho de 1 m h^{-1} . El reactor R3 operó sin recirculación con una velocidad ascensional de 0.1 m h^{-1} . En función de los resultados obtenidos relativos a la formación de biomasa granular, al iniciar la Fase III se prescindió de dicha corriente de recirculación de los reactores R1 y R2, de modo que durante esta fase la velocidad ascensional del líquido en los tres sistemas sólo estuvo determinada por el caudal de agua residual sintética aplicado, con valores comprendidos entre 0.1 y 0.3 m h^{-1} .

El control de la operación de los reactores y la evaluación de la eficacia del tratamiento se realizaron mediante la determinación de los parámetros que se muestran en la Tabla 5.2. También se llevaron a cabo análisis de la concentración de cationes y aniones de las muestras del afluente y del efluente de los reactores a fin de verificar el suministro de nutrientes. Estos análisis se realizaron semanalmente.

Tabla 5.2. Parámetros evaluados durante la operación de los reactores y frecuencia de determinación.

Parámetro	Frecuencia de determinación
pH	Diariamente
Temperatura	Diariamente
Conductividad	Diariamente
Alcalinidad	Diariamente
Concentración de ácidos grasos volátiles	Diariamente
Concentración de materia orgánica (DQO)	Dos veces por semana
Concentración de disolventes orgánicos	Dos veces por semana
Concentración de sólidos	Dos veces por semana
Caudal de metano*	Dos veces por semana
Composición del biogás*	Una vez por semana

*Parámetro determinado en la Fase III.

5.1.3 Evaluación de la variación de las características fisicoquímicas del fango granular.

La formación de biomasa granular se evaluó en función de la variación temporal de la distribución de tamaño de partícula y de la producción de polímeros extracelulares. Ambos parámetros se determinaron en muestras de fango extraídas del primer puerto de toma de muestra de los reactores en los días 0, 22, 54, 89, 112, 131, 190 y 219. Además, en el día 169 se determinó la distribución de tamaño de partícula. Al finalizar el estudio se tomaron muestras de fango granular de cada reactor para evaluar la velocidad de sedimentación, la actividad metanogénica específica, el potencial bioquímico de metano, y la morfología de los gránulos.

5.1.4 Análisis de las comunidades microbianas

El análisis de las comunidades microbianas y su variación durante la ejecución de los experimentos se realizó en el inóculo y en las muestras de fango tomadas de cada reactor en los días 37, 89, 131 y 169. En la Tabla 5.3 se presentan las muestras de fango analizadas y la técnica de biología molecular aplicada. El estudio de la variación temporal de las poblaciones microbianas se llevó a cabo mediante la técnica de DGGE. Además, el inóculo y las muestras correspondientes al día 169 se analizaron mediante secuenciación de alto rendimiento. Esta técnica de biología molecular se aplicó con el objetivo de validar los resultados obtenidos con la técnica de DGGE, de profundizar en la estructura de las poblaciones microbianas del inóculo y del fango granular de cada reactor, y de establecer posibles diferencias entre el reactor de control y los reactores operados con la adición de dosis únicas de quitosano.

Tabla 5.3. Muestras de fango analizadas y técnica de biología molecular aplicada.

Muestra	Día de operación	Técnica de biología molecular aplicada	
1	0	DGGE	Secuenciación de alto rendimiento
2	37	DGGE	-
3	89	DGGE	-
4	131	DGGE	-
5	169	DGGE	Secuenciación de alto rendimiento

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1 Determinación de la dosis óptima de quitosano

En la Figura 5.1 se presentan los resultados correspondientes al porcentaje de eliminación de la turbidez y al índice volumétrico de fangos en función de las dosis de quitosano aplicadas en el ensayo de jar-test. La turbidez y el índice volumétrico de fangos disminuyeron de manera significativa hasta valores del 65 % del valor inicial y $105,0 \text{ mL g SST}^{-1}$, respectivamente, al aplicar una dosis de quitosano de $1.2 \text{ mg g SSV}^{-1}$. Dosis superiores a $4.0 \text{ mg g SSV}^{-1}$ no evidenciaron una reducción apreciable en los parámetros evaluados. Para una dosis de quitosano de $2.4 \text{ mg g SSV}^{-1}$ se obtuvo una reducción de la turbidez del 83 % y un índice volumétrico

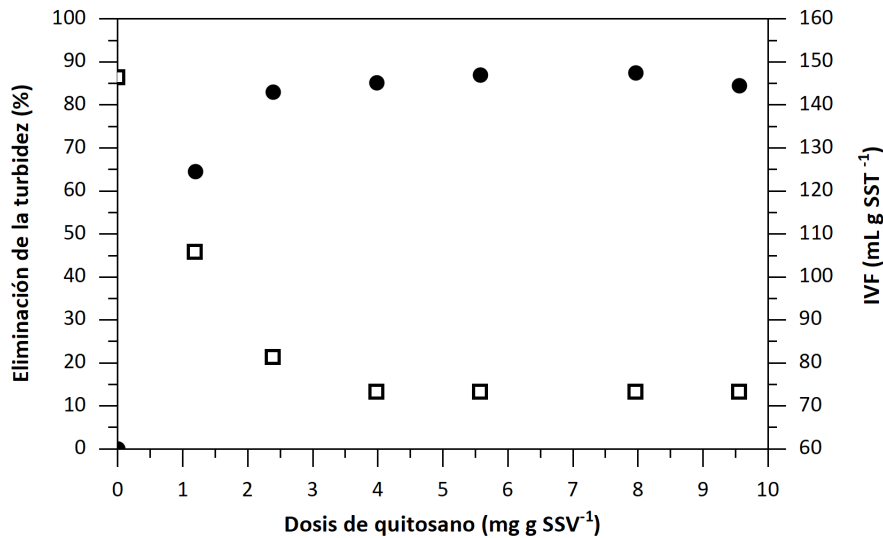


Figura 5.1. Porcentaje de eliminación de la turbidez (●) e índice volumétrico de fangos (IVF) (□) en función de las diferentes dosis de quitosano aplicadas en el ensayo de jar-test.

de fangos de 81.3 mL g SST⁻¹, mientras que con una dosis de 4.0 mg g SSV⁻¹ se obtuvieron valores del 85 % y 73.2 mL g SST⁻¹, respectivamente. Puesto que esta dosis es casi dos veces mayor que la inmediatamente anterior y, que el cambio observado en los parámetros no fue significativo, se consideró la dosis de 2.4 mg g SSV⁻¹ como la dosis óptima del polímero para promover la floculación del inóculo en suspensión. Khemkhao et al. (2011) reportaron una dosis de quitosano similar, de 2.0 mg g SSV⁻¹, en la floculación de un fango en suspensión empleado como inóculo de un reactor UASB aplicado al tratamiento de aguas residuales procedentes de la producción de aceite de palma. El-Mamouni et al. (1998) y Lafita et al. (2017) obtuvieron dosis óptimas de quitosano superiores, concretamente de 8 y 25 mg g SST⁻¹, respectivamente, para la floculación de fangos granulares desintegrados. Las diferencias entre la dosis óptima de quitosano obtenida en este estudio y otras reportadas en la bibliografía pueden atribuirse tanto a las características del medio en cuanto a su fuerza iónica, como a las propiedades del polímero utilizado.

Los mecanismos de la floculación en presencia de agentes floculantes explican el fenómeno a partir de dos factores principales (Bratby, 2006): 1) la disminución

del espesor de la doble capa eléctrica que rodea las partículas, permitiendo una aproximación de las mismas a distancias a las que las fuerzas de atracción superan a las fuerzas de repulsión electrostáticas que las mantienen dispersas, y 2) la interacción de los múltiples grupos funcionales eléctricamente cargados de las sustancias poliméricas con centros activos de diferentes partículas, provocando una unión entre éstas mediante la formación de puentes. El primer factor se ve favorecido por el aumento de la fuerza iónica del medio. En el segundo factor influye el número y tipo de grupos funcionales del polímero, que en el caso del quitosano, se encuentran condicionados por el grado de desacetilación y el peso molecular. Ambos efectos han sido estudiados por otros autores. Strand et al. (2003) encontraron que la concentración de quitosano necesaria para la floculación de una suspensión de microorganismos aumenta cuando la fuerza iónica es baja. Esto se debe a que la repulsión electrostática entre las dobles capas eléctricas que rodean las bacterias aumenta a bajas fuerzas iónicas del medio; por tanto, las células con bajas cantidades de quitosano no pueden acercarse lo suficiente para establecer una unión mediante el mecanismo de formación de puentes. (Yang et al., 2016). Kaseamchochung et al. (2006) estudiaron el efecto del grado de desacetilación del quitosano en la floculación de un fango en suspensión. Los autores evaluaron el proceso de floculación con polímeros de grado de desacetilación del 85 y del 70 %, encontrando que el porcentaje de floculación aumentó con el aumento del grado de desacetilación. Con una dosis de quitosano de 2 mg g SSV^{-1} , el porcentaje de floculación alcanzado con el polímero de mayor grado de desacetilación fue del 90 %, mientras que con el polímero de menor grado se alcanzó un porcentaje de floculación del 80 %. De acuerdo con Yang et al. (2016), el incremento del grado de desacetilación aumenta el número de grupos amino libres, resultando en una mayor densidad de carga que favorece la neutralización de cargas y la floculación mediante la formación de puentes. En cuanto al peso molecular, en formas de quitosano con un alto peso molecular, la conformación más extensa de la cadena polimérica mejora la floculación por efectos de barrido y por la formación de puentes (Yang et al., 2016).

5.2.2 Operación de los reactores UASB

En este apartado se describen y se analizan los resultados correspondientes a la operación y rendimiento de los reactores UASB durante los 219 días de duración del estudio, analizándose la eficacia de degradación de la materia orgánica, la

estabilidad del proceso, la producción de metano y la eficacia de degradación particular de cada uno de los disolventes orgánicos. En la Tabla 5.4 se presentan los resultados promedio obtenidos en cada fase operacional. Para el control del pH de los reactores se suministró una concentración de NaHCO_3 de 5.0 g L^{-1} en el tanque de alimento durante la Fase I; durante las fases posteriores se redujo la concentración hasta un valor de 4.0 g L^{-1} . La disminución del suministro de NaHCO_3 provocó la disminución de la alcalinidad en el efluente de los tres sistemas. Este hecho, junto con el aumento de la carga orgánica en el transcurso del estudio, produjo la disminución del pH desde valores cercanos a 8.0 hasta valores de 7.5, más próximos a la neutralidad. Asimismo, puesto que la conductividad del agua residual está supeditada a la concentración de electrolitos en solución, ésta disminuyó al producirse la disminución del suministro de bicarbonato. De los resultados obtenidos se puede destacar, además, la mayor eficacia de eliminación de la materia orgánica de los reactores que fueron inoculados con quitosano, R2 y R3, durante la Fase I. Estos reactores alcanzaron eficacias de eliminación superiores al 90 % en comparación con un valor entorno al 80 % alcanzado en el reactor R1. La menor eficacia de eliminación de este reactor se relaciona con una mayor concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente, como se detalla más adelante, y con la menor eficacia de degradación del disolvente 1-etoxi-2-propanol, que presentó un valor promedio del $40 \pm 6 \%$ respecto a valores del $75 \pm 11 \%$ en el reactor R2 y del $74 \pm 10 \%$ en el reactor R3. Estos resultados indican que la adición de una dosis única de quitosano de $2.4 \text{ mg g SSV}^{-1}$ contribuyó a una mayor eficacia de degradación de la materia orgánica y a la adaptación más rápida del fango a los disolventes orgánicos alimentados. En los siguientes apartados se describen y se analizan con mayor detalle los resultados obtenidos durante cada fase de operación.

Tabla 5.4. Resultados de los parámetros de control y de rendimiento evaluados durante el estudio.

Tiempo (días)	Fase I (0 - 22)			Fase II (23 - 89)			Fase III (90 - 219)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)		0.3-0.6		2.3	2.3	4.0	5-20	5-20	8-20
CO _{E2P} (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)		0.03-0.06		0.24	0.24	0.42	0.53-2.11	0.53-2.11	0.85-2.11
EE (%)	80 ± 3	91 ± 4	91 ± 3	92 ± 6	96 ± 2	96 ± 2	90 ± 5	92 ± 3	94 ± 4
EE _{E2P} (%)	40 ± 6	75 ± 11	74 ± 10	72 ± 4	79 ± 6	77 ± 2	65 ± 10	70 ± 7	69 ± 8
Y CH ₄ (Nm ³ CH ₄ kg DQO ⁻¹ degradada)	-	-	-	-	-	-	0.309 ± 0.033	0.320 ± 0.032	0.341 ± 0.027
pH	7.9 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1	7.7 ± 0.3	7.7 ± 0.3	7.8 ± 0.2	7.5 ± 0.2	7.5 ± 0.2	7.5 ± 0.1
Conductividad (mS cm ⁻¹)	5.0 ± 0.9	5.5 ± 0.7	4.8 ± 0.9	4.4 ± 0.7	4.4 ± 0.7	4.4 ± 0.6	4.7 ± 0.4	4.8 ± 0.4	4.8 ± 0.3
Alcalinidad (g CaCO ₃ L ⁻¹)	2.4 ± 0.5	3.0 ± 0.3	2.7 ± 0.5	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2

CO: carga orgánica volumétrica total; CO_{E2P}: carga orgánica de 1-etoxi-2-propanol; YCH₄: rendimiento de metano.

Eficacia de eliminación de la materia orgánica y estabilidad

En la Figura 5.2 se presenta la carga orgánica volumétrica aplicada a los tres reactores en cada fase de operación y los resultados correspondientes a la eficacia de eliminación de la materia orgánica. En la Figura 5.3 se muestra la variación temporal de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente de los reactores.

Tras la inoculación de los sistemas se obtuvieron eficacias de eliminación de la materia orgánica del 77, 88 y 90 % en el reactor de control (R1) y en los reactores con una adición única de quitosano, R2 y R3, respectivamente. Durante la primera fase de operación se observó una adaptación más rápida de estos reactores a la degradación del agua residual sintética contaminada con la mezcla de disolventes orgánicos, alcanzando eficacias de eliminación superiores al 92 % a partir del día 11 de operación, mientras que en el reactor R1 la eficacia de eliminación alcanzada fue del 84 % al finalizar el periodo de adaptación en el día 22. En cuanto a la variación de la concentración de ácidos grasos volátiles, los reactores con quitosano también evidenciaron mejores resultados con valores inferiores a 75 mg L^{-1} después de 9 días de operación. Al finalizar la Fase I no se detectaron ácidos grasos volátiles en el efluente de estos sistemas, demostrando así el equilibrio entre las etapas de acidogénesis y metanogénesis. En contraste, la concentración de ácidos grasos volátiles en el reactor de control permaneció en valores relativamente altos en el intervalo de 228 a 389 mg L^{-1} durante toda la Fase I. En este periodo, operando a la misma carga orgánica volumétrica, pero con diferentes velocidades ascensionales del líquido (Tabla 5.1), no se apreciaron diferencias entre los reactores con quitosano, R2 y R3.

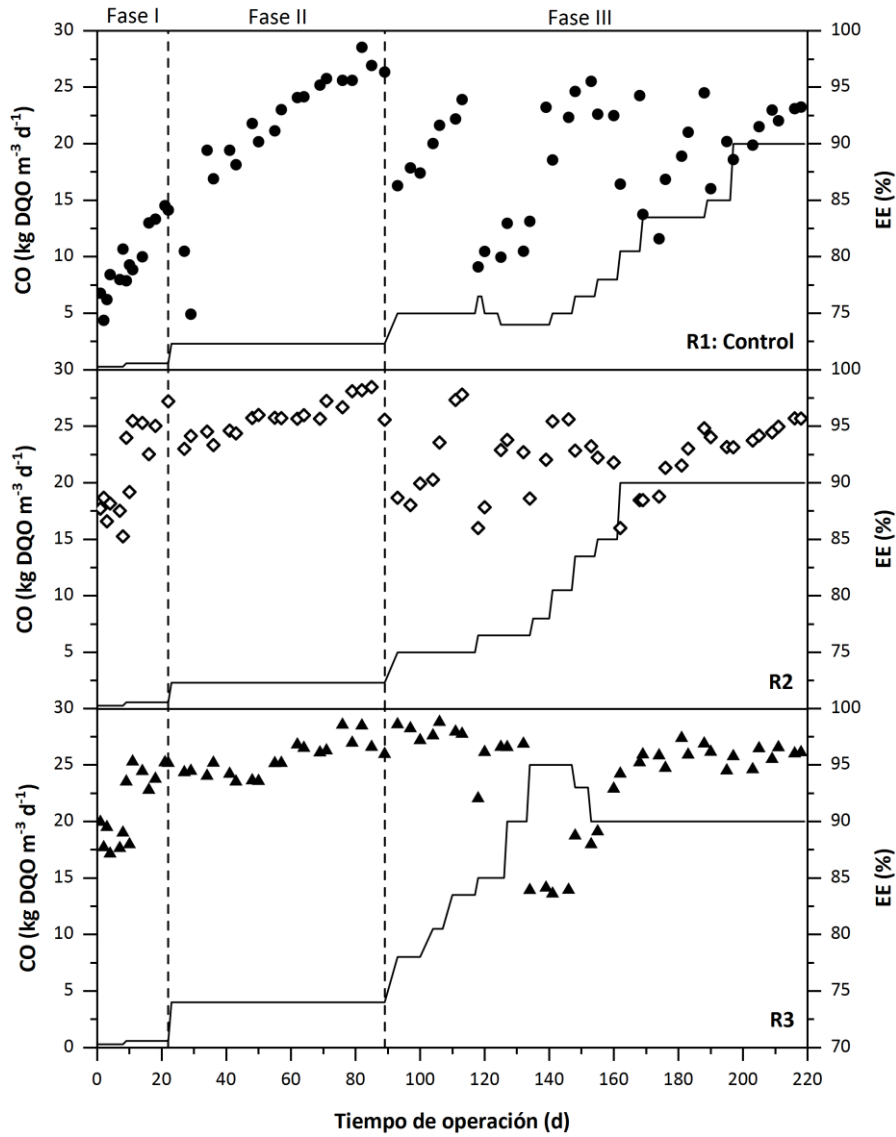


Figura 5.2. Variación temporal de la carga orgánica volumétrica aplicada (—) y de la eficacia de eliminación de la DQO en cada reactor UASB (R1●; R2◇; R3▲).

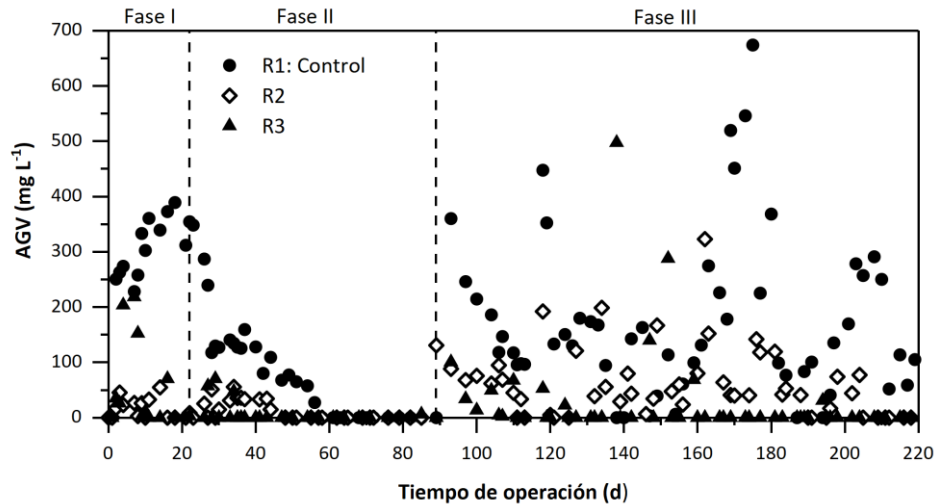


Figura 5.3. Variación temporal de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en el efluente de cada reactor UASB.

La Fase II se inició en el día 23 con la aplicación de una segunda dosis de quitosano a los reactores R2 y R3, y con el incremento de la carga orgánica en los tres sistemas a un valor de 18 g DQO d^{-1} , equivalente a $2.3 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para los reactores R1 y R2, y a $4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ para el R3. Pese al aumento en la carga orgánica volumétrica, en los reactores R2 y R3 no se observó el descenso de la eficacia de eliminación, manteniéndose en valores comprendidos entre el 93 y el 99 %. En el caso del reactor de control, la eficacia de eliminación descendió a un valor del 75 % para luego alcanzar de manera progresiva un valor del 97 % al final de la Fase II. La concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente del reactor R1 se mantuvo por encima de los valores observados en los reactores R2 y R3 (entre 0 y 70 mg L^{-1}) hasta el día 57, a partir del cual no se detectaron ácidos grasos volátiles en el efluente de este reactor. Comparando los tiempos requeridos para alcanzar altas eficacias de eliminación, en este caso superiores al 92 %, se observa que para el reactor de control fue necesario un periodo de 57 días, mientras que los reactores con quitosano alcanzaron dicho valor en tan sólo 11 días de operación. Así, los resultados obtenidos en las fases de operación I y II muestran que la aplicación de dos dosis únicas de quitosano disminuyó el período de aclimatación de un fango en suspensión en reactores UASB aplicados al tratamiento de disolventes orgánicos, mejorando la velocidad de degradación del sustrato orgánico. En otros estudios también se ha observado dicha disminución del tiempo de adaptación y la mejora del rendimiento de reactores UASB al adicionar quitosano u otros polímeros

catiónicos durante la puesta en marcha. Hudayah et al. (2016) obtuvieron una eficacia de eliminación un 6 % superior en un reactor UASB alimentado con ácidos grasos volátiles operado con dosis semanales de quitosano (durante 58 días), respecto al reactor de control, aplicando una carga orgánica de $1.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. En el estudio realizado por Khemkhao et al. (2011), aplicando cargas orgánicas entre 2.3 y $9.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, los autores reportaron eficacias de eliminación un 5 % más altas en el reactor al cual se adicionó quitosano durante la inoculación. Por su parte, Show et al. (2004) observaron que la adición de una dosis única de un polímero catiónico sintético con una concentración óptima de 80 mg L^{-1} a un reactor UASB alimentado con un agua residual con glucosa como principal fuente de carbono orgánico, redujo en un 52 % el tiempo requerido para alcanzar una operación estable a $8 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. La mejora en la puesta en marcha de los reactores asistidos con quitosano puede atribuirse a la formación más temprana de agregados, tal como se discutirá en la siguiente sección.

Con el propósito de promover la formación de biomasa granular, al iniciar la Fase III se modificó la estrategia de operación de los sistemas, aplicando incrementos graduales de la carga orgánica volumétrica hasta alcanzar un valor máximo de $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. El aumento en la carga orgánica en cada reactor se efectuó de manera independiente una vez fueron alcanzadas eficacias de eliminación estables y concentraciones de ácidos grasos volátiles en el efluente inferiores a 150 mg L^{-1} durante al menos tres veces el tiempo de retención hidráulico aplicado. Además, a la vista de los resultados obtenidos en cuanto a la formación de biomasa granular al finalizar la Fase II (sección 5.2.3), y que mostraron mejores indicadores en el reactor R3 que operaba sin recirculación desde el inicio del estudio, al iniciarse la Fase III se eliminó la corriente de recirculación de los reactores R1 y R2. En la Figura 5.2 se puede observar que durante la Fase III cada aumento de la carga orgánica produjo, en general, un descenso en la eficacia de eliminación. No obstante, para cada incremento aplicado las eficacias de eliminación fueron superiores al 90 % cuando los reactores alcanzaron condiciones de operación estables, demostrando su capacidad para efectuar el tratamiento del agua residual sintética contaminada con la mezcla de disolventes orgánicos. En esta fase se observaron diferencias significativas en el rendimiento de los tres reactores. A modo de ejemplo, en los reactores R1 y R2 fueron necesarios 24 días para alcanzar un rendimiento estable operando a una carga orgánica de $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Por su parte, durante este periodo, en el reactor R3 se aplicaron cargas orgánicas de hasta $13.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ a la vista de los buenos resultados obtenidos en cuanto a la

eficacia de eliminación de la materia orgánica (valor promedio del 98 %) y a la baja concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente. La concentración de ácidos grasos volátiles en el reactor de control (R1) aumentó, en respuesta al primer incremento de la carga, hasta 360 mg L^{-1} , y disminuyó hasta un valor de 96 mg L^{-1} previo al siguiente aumento de la carga orgánica. En los reactores R2 y R3 la concentración de ácidos grasos volátiles, tras un ligero aumento al inicio de la Fase III, se mantuvo en valores inferiores a 100 mg L^{-1} operando a las cargas orgánicas indicadas.

En el día 119 se efectuó el incremento de la carga orgánica en los reactores R1 y R2 a un valor de $6.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, correspondiente a un tiempo de retención hidráulico de 20 horas y a una concentración de sustrato orgánico de 5.4 g DQO L^{-1} en la corriente de entrada. El aumento de la carga produjo un incremento inicial de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente del reactor R2 hasta 192 mg L^{-1} , con el descenso de la eficacia de eliminación hasta el 86 %. Por otra parte, en el reactor de control la concentración de ácidos grasos volátiles aumentó hasta un valor de 448 mg L^{-1} , con el descenso concomitante de la eficacia de eliminación hasta el 79 %. A fin de evitar problemas operacionales derivados de la acumulación de ácidos grasos volátiles y la afectación de las comunidades metanogénicas, la carga orgánica en este reactor se redujo a $4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ hasta alcanzar eficacias de eliminación superiores al 85 % y concentraciones de ácidos grasos volátiles en el efluente inferiores a 150 mg L^{-1} . Posteriormente, en el día 148, la carga orgánica se incrementó de nuevo a $6.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en este reactor sin observarse el deterioro del rendimiento del mismo. La respuesta de los reactores con quitosano al incremento de la carga orgánica durante la Fase III fue diferente a la del reactor de control. En el efluente del reactor R1 se observó una oscilación mayor en la concentración de ácidos grasos volátiles con un valor de $176 \pm 146 \text{ mg L}^{-1}$, contrastando con los valores de $60 \pm 63 \text{ mg L}^{-1}$ y $26 \pm 81 \text{ mg L}^{-1}$ observados en los reactores R2 y R3, respectivamente. Además, la adición del polímero permitió disminuir de manera notable el tiempo requerido para poder aplicar la carga orgánica máxima objetivo. Así, en los reactores R2 y R3 fue posible aplicar la carga orgánica de $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ con eficacias de eliminación superiores al 93 % tras 72 y 37 días desde el inicio de la Fase III, mientras que en el reactor de control fueron necesarios 107 días para alcanzar dicha carga orgánica con una eficacia de eliminación similar.

Entre los días 133 y 147 en el reactor R3 se aplicó una carga orgánica de 25 kg DQO m⁻³ d⁻¹, lo cual condujo a la disminución de la eficacia de eliminación hasta un valor del 84 % con un aumento en la concentración de ácidos grasos volátiles oscilando entre 140 y 500 mg L⁻¹. En el día 145 se observó una concentración de biomasa en el efluente de 846 mg SSV L⁻¹, excediendo el valor de 30 mg SSV L⁻¹ que se había observado durante la operación estable, indicando un periodo de lavado de biomasa como resultado del aumento de la carga hasta el valor de 25 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Para evitar la pérdida de biomasa del sistema y recuperar las condiciones de estabilidad, la carga orgánica se redujo de nuevo hasta un valor de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹. A partir del día 159 se observaron de nuevo eficacias de eliminación superiores al 93 % y no se detectaron ácidos grasos volátiles en el efluente, evidenciando la recuperación de la operación estable de este reactor.

Producción de metano

El caudal de metano producido en los tres reactores se determinó durante la Fase III del experimento. Dicha producción de metano en función de la carga orgánica degradada en cada reactor, se ilustra en la Figura 5.4. La producción de metano aumentó de manera lineal (R^2 entre 0.986 y 0.998) con el aumento de la carga orgánica degradada en los tres sistemas. El rendimiento de metano obtenido en cada reactor, estimado como la producción de metano por unidad de materia orgánica degradada, fue de $0.292 \pm 0.008 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el reactor de control, $0.323 \pm 0.004 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el reactor R2 y $0.335 \pm 0.005 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el reactor R3. Los valores obtenidos se encuentran en el intervalo reportado por otros autores para el tratamiento anaerobio de disolventes orgánicos en reactores de alta carga. Ferrero et al. (2018) obtuvieron rendimientos de metano de $0.324 \pm 0.051 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en un reactor EGSB y $0.318 \pm 0.049 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en un reactor híbrido, ambos empleados para el tratamiento de mezclas de etanol y de los éteres de glicol 1-etoxi-2-propanol y 1-metoxi-2-propanol. Enright et al. (2009) reportaron rendimientos de metano en el intervalo de 0.110 a 0.350 m³ CH₄ kg DQO⁻¹_{degradada} en el tratamiento de un agua residual contaminada con una mezcla compuesta por etanol, acetona, propanol y metanol en reactores híbridos. Así pues, teniendo en cuenta que el rendimiento teórico de metano es de 0.35 Nm³ CH₄ kg DQO⁻¹_{degradada}, los reactores UASB son sistemas de tratamiento eficaces para la obtención de metano a partir de la degradación de los disolventes orgánicos utilizados en este estudio.

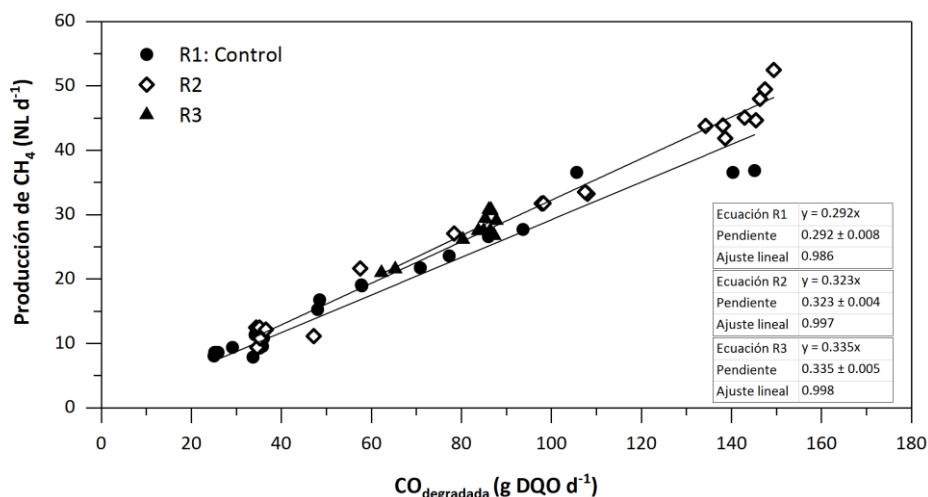


Figura 5.4. Producción de metano en cada reactor en función de la carga orgánica degradada.

La obtención de rendimientos de metano más altos en los reactores con quitosano, entre un 10 y 12 % respecto al reactor de control, demuestra que dosis únicas de este polímero durante la puesta en marcha pueden mejorar la producción de metano, tal como se ha observado en otros estudios (Khemkhao et al., 2016, 2011; Lertsittichai et al., 2007). Khemkhao et al. (2011) observaron una producción mayor de metano al aplicar una dosis de 2 mg de quitosano g SSV⁻¹ a un reactor UASB inoculado con un fango en suspensión. A partir del análisis cualitativo de las comunidades microbianas, se observó que la adición de quitosano resultó en una mayor retención de microorganismos del género *Methanosaeta*, respecto al reactor de control, al cual no se adicionó el polímero. Estos autores sugirieron que la adición de quitosano podría mejorar la agregación de microorganismos acidogénicos alrededor de núcleos de *Methanosaeta*, motivo por el cual estos últimos microorganismos serían menos susceptibles al lavado de biomasa. En otro estudio conducido por estos mismos autores (Khemkhao et al., 2016), se encontró que la adición periódica de quitosano afectó a la población de metanógenos del orden *Methanosarcinales*, resultando en una capacidad de tratamiento 7.5 kg DQO m⁻³ d⁻¹ mayor que la del reactor al cual no se aplicó el polímero y en una producción mayor de metano. Así pues, la posible mayor retención de metanógenos durante la Fase III, pese al incremento de las fuerzas de cizalladura derivadas del aumento en la producción de biogás y de la disminución del TRH, pudo conducir al mayor rendimiento de metano observado en este estudio en los reactores con quitosano.

En contraste con los resultados expuestos anteriormente, El-Mamouni et al. (1998) y Lafita et al. (2017) no observaron un aumento del rendimiento de metano al adicionar quitosano para mejorar la granulación de fangos anaerobios. No obstante, cabe destacar que en ambos estudios se emplearon fangos parcialmente granulados para la realización de los experimentos. En los fangos con morfología granular se establecen interacciones sintróficas entre microorganismos que resultan en una mayor velocidad de degradación del sustrato orgánico y en una alta actividad metanogénica específica (Hulshoff Pol et al., 2004; Schmidt y Ahring, 1996). En estos casos, el efecto del quitosano puede ser menos significativo en cuanto a la producción de biogás debido a la presencia desde el inicio de la operación de dichas interacciones. En contraste, la aplicación de quitosano a reactores inoculados con fangos en suspensión podría favorecer la formación de consorcios sintróficos, observándose así una mayor velocidad de degradación del sustrato y una mayor producción de biogás (Khemkhao et al., 2016) frente a fangos a los que no se ha aportado el polímero.

Eficacia de degradación de los disolventes orgánicos

Junto con el rendimiento global de la operación de los reactores, se evaluó la eficacia de degradación individual de los disolventes orgánicos alimentados. Los análisis cromatográficos mostraron concentraciones de etanol y de acetato de etilo inferiores a 10 mg L^{-1} durante las tres fases operacionales, mientras que el 1-etoxi-2-propanol estuvo presente en el efluente de los tres reactores en concentraciones en el intervalo de 20 a 160 mg L^{-1} . Así, las eficacias de degradación de los distintos disolventes orgánicos presentaron valores promedio del 99 % para el etanol y el acetato de etilo, y entre el 65 y el 73 % para el 1-etoxi-2-propanol durante el estudio. De acuerdo con los resultados obtenidos de la degradación de cada uno de los disolventes, se valoró en mayor detalle la degradación del 1-etoxi-2-propanol.

Ferrero et al. (2018) propusieron un mecanismo para la degradación anaerobia del 1-etoxi-2-propanol a partir de los resultados experimentales obtenidos en la degradación de mezclas de etanol, 1-etoxi-2-propanol y 1-metoxi-2-propanol. De acuerdo con estos autores, los productos de la escisión del enlace éter del 1-etoxi-2-propanol podrían ser etanol y acetona (Figura 1.6). En este estudio también se detectó isopropanol de manera transitoria tras las primeras semanas de exposición de la biomasa al 1-etoxi-2-propanol. En los ensayos realizados en la presente tesis doctoral, el etanol alimentado a los reactores fue degradado con eficacias superiores al 99 %

durante las diferentes fases del estudio, por lo que no se pudo identificar este compuesto como intermediario de la ruta de degradación del 1-etoxi-2-propanol. Sí se detectó acetona en el efluente de los tres reactores, aunque en concentraciones inferiores a 10 mg L^{-1} , así como isopropanol, también en concentraciones inferiores a 10 mg L^{-1} en consonancia con las observaciones de Ferrero et al. (2018). La presencia de isopropanol en reactores anaerobios empleados para el tratamiento de aguas residuales que contienen 1-etoxi-2-propanol puede atribuirse, de acuerdo con Zellner y Winter (1987), a la reducción de la acetona en presencia de hidrógeno. Se trata de una reacción redox reversible que transcurre hacia acetona o isopropanol según la presión parcial de hidrógeno en el medio. Las bajas concentraciones de acetona e isopropanol detectadas indicarían la conversión de ambos compuestos a ácido acético e hidrógeno en la etapa acetogénica del proceso de degradación anaerobia y, finalmente a metano.

En la Figura 5.5 se presenta la variación temporal de la carga de 1-etoxi-2-propanol aplicada a cada reactor UASB y la eficacia de eliminación de este disolvente orgánico. Los reactores con quitosano alcanzaron eficacias de eliminación del 1-etoxi-2-propanol del 79 % a partir del día 14 de operación, mientras que en el reactor de control fueron necesarios 34 días para alcanzar una eficacia de eliminación del 72 %. Estos resultados ponen de manifiesto que la adición de quitosano contribuyó a disminuir el tiempo de adaptación requerido por un fango en suspensión para metabolizar este éter de glicol al facilitar la agregación de los microorganismos involucrados en su degradación. El tiempo requerido para la adaptación de la biomasa a la degradación de este sustrato orgánico puede estar relacionado con el desarrollo de las enzimas necesarias para efectuar la degradación del enlace éter, tal como señalaron Lafita et al. (2015), quienes reportaron un periodo de adaptación de 34-40 días para alcanzar eficacias de eliminación del éter de glicol 1-metoxi-2-propanol superiores al 50 % en un reactor EGSB. En un estudio más reciente, Lafita et al. (2017) encontraron que la adición de quitosano redujo en 16 días el tiempo requerido para alcanzar eficacias de eliminación del 1-metoxi-2-propanol superiores al 80 %. En cuanto al 1-etoxi-2-propanol, Ferrero et al. (2018) reportaron periodos de aclimatación de 11 y 16 días para alcanzar eficacias de eliminación superiores al 50 % en un reactor EGSB y en un reactor híbrido, respectivamente, alimentados con una carga de 1-etoxi-2-propanol de $5.1 \pm 0.8 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ lecho d}^{-1}$, mientras que para alcanzar una eficacia del 80 % en ambos reactores fue necesario un periodo de 40-

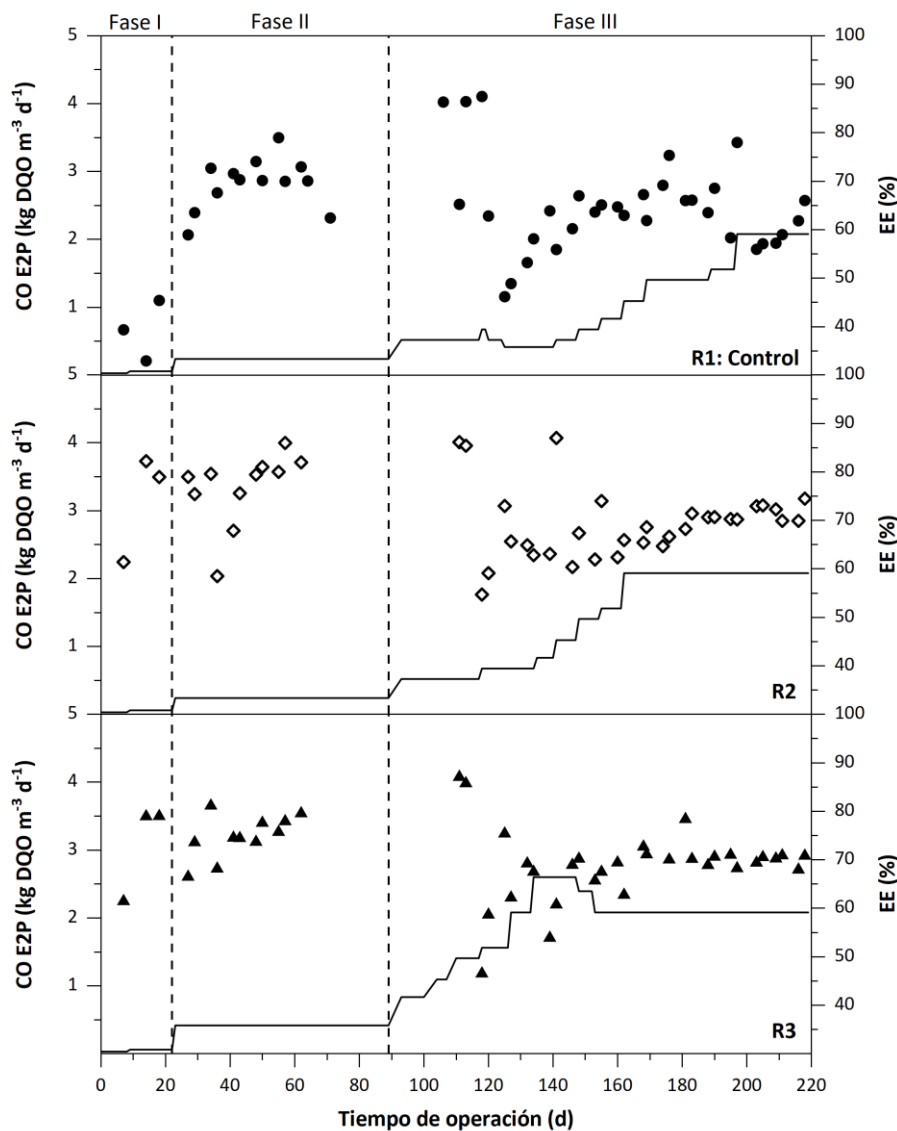


Figura 5.5. Variación temporal de la carga de 1-etoxi-2-propanol (E2P) aplicada (—) y su eficacia de eliminación en cada reactor UASB (R1●; R2◇; R3▲).

50 días. Este periodo fue similar al requerido en el reactor de control del presente estudio, incluso operando con una carga baja de 1-etoxi-2-propanol de 0.24 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Este reactor, además, presentó una eficacia de eliminación más oscilante que los reactores con quitosano en respuesta a los incrementos de la carga

orgánica aplicados en cada fase de operación. Al finalizar el estudio, operando a una carga orgánica de $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ de 1-etoxi-2-propanol, la eficacia de eliminación promedio fue del 62 ± 9 , 70 ± 3 y 71 ± 2 % para los reactores R1, R2 y R3, respectivamente. La presencia de 1-etoxi-2-propanol en el efluente de los tres sistemas y la presencia de los posibles productos intermediarios de su degradación en bajas concentraciones, sugieren que la ruptura del enlace éter sería la etapa limitante para la degradación anaerobia de este disolvente orgánico.

5.2.3 Formación de biomasa granular

En este apartado se describen y discuten los resultados correspondientes a la formación de biomasa granular en los tres reactores UASB a partir del fango en suspensión (Inóculo I) procedente del digestor anaerobio de una estación depuradora de aguas residuales municipales, y el efecto de la adición del polímero natural quitosano sobre el proceso de granulación. La formación de gránulos a lo largo del experimento se analizó de acuerdo con la variación de las características fisicoquímicas de la biomasa, como el tamaño de partícula y la producción de polímeros extracelulares. Al finalizar el estudio, con el propósito de determinar la calidad del fango granular obtenido, se evaluaron otras características como la velocidad de sedimentación, la actividad metanogénica específica y la morfología de los gránulos.

Variación temporal del tamaño de partícula

En la Tabla 5.5 se presenta la variación temporal del porcentaje de gránulos en cada reactor. En este estudio se consideraron como gránulos las partículas con un tamaño superior a $300 \mu\text{m}$, de acuerdo con el tamaño mínimo recomendado en la bibliografía (Bhunia y Ghangrekar, 2007). El porcentaje de gránulos aumentó desde un valor del 0.3 % en el inóculo hasta valores del 3.0, 4.0 y 6.8 % en los reactores R1, R2 y R3, respectivamente, al finalizar la primera fase de operación en el día 22. Al inicio de la Fase II, en el día 23, se realizó una segunda adición de quitosano a los reactores R2 y R3, y los resultados del día 54 mostraron que en este último reactor —el cual fue operado sin corriente de recirculación con una velocidad ascensional de 0.1 m h^{-1} — el porcentaje de gránulos fue mayor (22.2 %) que en los otros dos reactores. De los reactores que operaron durante esta fase con corriente de recirculación para proporcionar una velocidad ascensional en el lecho de 1.0 m h^{-1} ,

el reactor R2 evidenció un aumento ligeramente mayor en el porcentaje de gránulos con un valor del 6.3 % frente al 4.9 % en el reactor R1. Al finalizar la Fase II en el día 89, el porcentaje de gránulos en el reactor R3 fue del 21.9 %, mientras que en los reactores que operaron con una velocidad ascensional del líquido alta, R1 y R2, fue del 4.9 y del 8.5 %, respectivamente.

Tabla 5.5. Variación temporal del porcentaje de gránulos en los reactores UASB.

Día	Fase I			Fase II			Fase III					
	V _a	%		V _a	%		V _a	%				
		0	22		54	89		112	131	169	190	219
R1	1.0	0.3	3.0	1.0	4.9	4.9	0.3	4.9	18.1	25.4	33.0	42.0
R2	1.0	0.3	4.0	1.0	6.3	8.5	0.3	22.7	25.0	40.2	56.4	54.0
R3	0.1	0.3	6.8	0.1	22.2	21.9	0.3	24.5	30.1	57.3	65.7	64.7

Va: velocidad ascensional máxima (m h⁻¹) en cada fase de operación.

De acuerdo con la teoría de la presión selectiva, la formación de biomasa granular tiene lugar mediante la selección continua de la partículas del fango anaerobio atendiendo a sus características de sedimentación (Hulshoff Pol et al., 1983). La presión selectiva corresponde al patrón de flujo ascendente inducido por la carga hidráulica aplicada al reactor, es decir, el caudal de líquido que entra al sistema por unidad de área, y por el caudal de biogás, que a su vez depende de la carga orgánica aplicada. Ambos factores se consideran importantes para promover la selección de las partículas que componen el fango (Hulshoff Pol et al., 2004). En condiciones de alta presión selectiva, las partículas de fango más ligeras y dispersas son lavadas del sistema, limitándose el crecimiento de la biomasa a las partículas más pesadas o más densas que se retienen en el reactor. Estas partículas consisten, bien en agregados iniciales de microorganismos, o bien en partículas inorgánicas que pueden servir como portadores de biomasa, promoviendo así la formación de gránulos (Hulshoff Pol, 1989; Hulshoff Pol et al., 2004). Durante la Fase II de este estudio se observó la acumulación de partículas finas en la zona de sedimentación de los reactores R1 y R2 que operaron con recirculación y una velocidad ascensional del líquido de 1.0 m h⁻¹. Dichas partículas se recirculaban continuamente al interior de éstos reactores y, de manera consecuente, su lavado con el efluente fue bajo. Lettinga (1995) destaca la importancia de eliminar las partículas finas durante la puesta en marcha de reactores UASB mediante la aplicación de una presión selectiva, y recomiendan que dichas partículas no sean retornadas al reactor, a fin de promover el crecimiento de las partículas más densas. La recirculación continua

de las partículas finas al interior de los reactores R1 y R2 podría explicar la diferencia entre la distribución de tamaño de la biomasa de ambos sistemas y la del reactor R3, el cual operó sin corriente de recirculación y para el que la presión selectiva sólo estuvo determinada por el aumento del caudal de agua residual sintética, conforme se aumentó la carga hidráulica, y por el incremento en la producción de biogás.

En la Figura 5.6 se muestra la distribución de tamaño de partícula y su variación temporal. En esta figura se puede apreciar la disminución considerable del porcentaje de partículas con un tamaño inferior a $100 \mu\text{m}$ en el reactor R3 durante la Fase II respecto al fango inicial. En los reactores operados con recirculación dicha disminución es menos acusada. El porcentaje de partículas con un tamaño inferior a $100 \mu\text{m}$ disminuyó un 50 % en el reactor R3 al finalizar la Fase II, mientras que en los reactores R1 y R2, la disminución fue sólo del 11 y del 15 %, respectivamente. A partir de los resultados obtenidos en las fases de operación I y II se decidió suprimir la corriente de recirculación en los reactores R1 y R2, de modo que durante la Fase III todos los sistemas operaron con velocidad ascensional del líquido entre 0.1 y 0.3 m h^{-1} en función de la carga hidráulica aplicada. Bajo estas condiciones, los gránulos crecieron más rápido en los reactores a los que se añadió quitosano con diferencias considerables en la distribución de tamaño de partícula.

En la Tabla 5.5 se observa que en el día 112, 22 días después del inicio de la Fase III, el porcentaje de gránulos en el reactor R1 no aumentó. En contraste, en los reactores R2 y R3 el porcentaje de gránulos en este día fue del 22.7 y del 24.5 %, respectivamente. En los días siguientes, el porcentaje de gránulos aumentó progresivamente hasta alcanzar valores del 42.0 % en el reactor R1, del 54.0 % en el reactor R2 y del 64.7 % en el reactor R3 en el día 219. El incremento cuantitativamente representativo del porcentaje de gránulos ($> 20 \%$) se produjo en el reactor R3 en 54 días, en el reactor R2 en 112 días y en el reactor R1 en 169 días, mostrando el efecto de la velocidad ascensional y de la adición de quitosano en la formación de biomasa granular. En cuanto a la distribución de tamaño de partícula, cabe destacar que los gránulos con un tamaño superior a $1000 \mu\text{m}$ aparecieron primero en los reactores con quitosano, y que sólo se encontraron gránulos con un tamaño superior a $2000 \mu\text{m}$ en estos reactores (Figura 5.6), alcanzando un porcentaje del 2.0 % en el reactor R2 y del 7.1 % en el reactor R3 en el día 219. Al final del estudio,

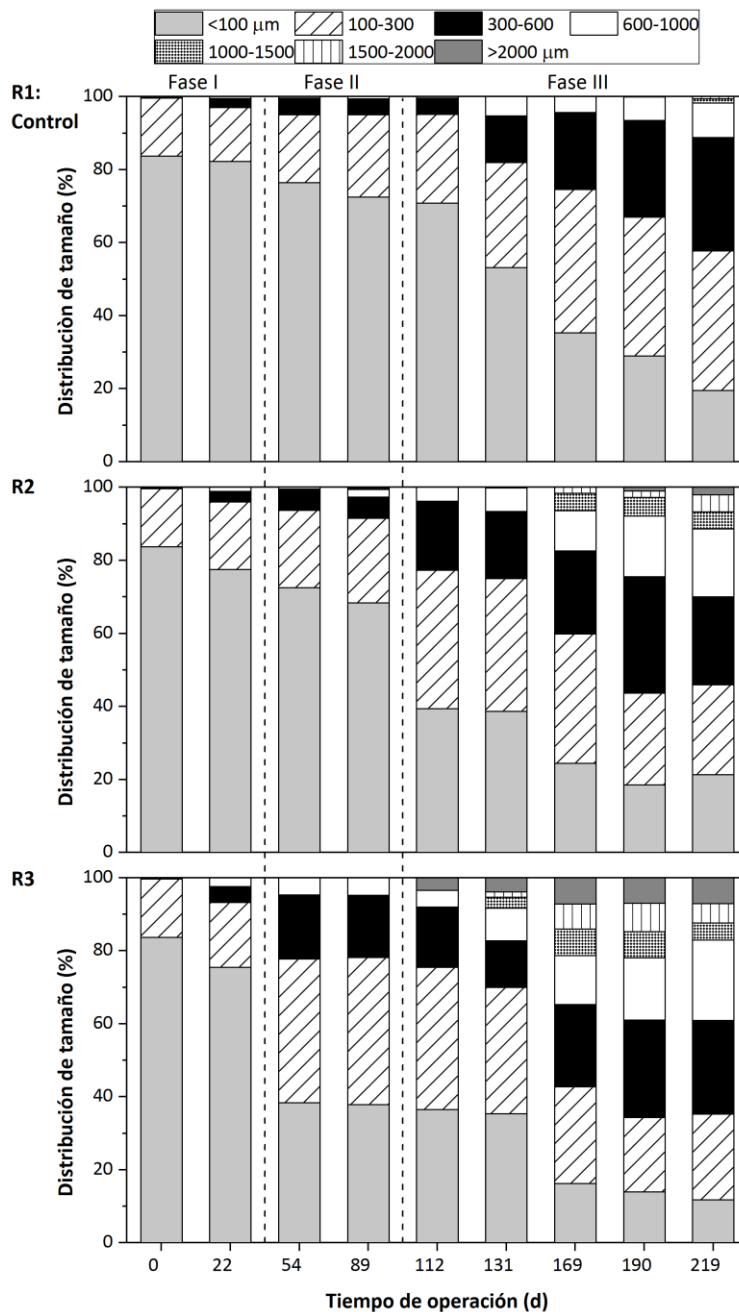


Figura 5.6. Variación temporal de la distribución de tamaño de partícula en los reactores UASB.

el diámetro medio de partícula fue considerablemente más alto en los reactores R2 y R3 con valores de 540 y 613 μm , respectivamente, contrastando con el valor de 300 μm que se obtuvo en el reactor de control.

Una de las características del fango granular que posibilita la aplicación de altas cargas orgánicas en los reactores UASB es su alta velocidad de sedimentación. Esta alta velocidad de sedimentación permite la inmovilización de mayores concentraciones de biomasa activa en el reactor, desacoplando así el TRH y el TRS (Hulshoff Pol et al., 2004). En la bibliografía se han descrito fangos granulares con velocidades de sedimentación en el intervalo comprendido entre 18 y 100 m h^{-1} como fangos con buenas características de sedimentación (Ghangrekar et al., 2005). En este estudio, los gránulos del reactor de control presentaron una velocidad de sedimentación de 26.4 m h^{-1} ; mientras que los gránulos extraídos de los reactores con quitosano exhibieron una velocidad de sedimentación mayor: 1.4 veces mayor para los gránulos del reactor R2 (36.7 m h^{-1}) y 1.8 veces mayor para los gránulos del reactor R3 (46.8 m h^{-1}). Las velocidades de sedimentación del fango granular de los tres sistemas se encuentran en el intervalo recomendado en la bibliografía. No obstante, los valores superiores obtenidos en los sistemas con quitosano corroboran los resultados acerca de la efectividad del polímero para acelerar la formación de gránulos con mejores características físicas en reactores anaerobios alimentados con aguas residuales que contienen los disolventes orgánicos utilizados en este estudio.

Los resultados expuestos permiten inferir que el crecimiento de los gránulos tuvo lugar en los tres reactores UASB como consecuencia del aumento gradual en la carga orgánica volumétrica. Sin embargo, el proceso de granulación fue acelerado en los reactores asistidos con quitosano, con una mejora concomitante en la retención de la biomasa y en la actividad metanogénica específica, como así lo evidenció el mejor rendimiento de estos sistemas. Estudios previos han destacado los posibles efectos del quitosano sobre la floculación de fangos en suspensión. Por ejemplo, Yang et al. (2016) han sugerido que los principales mecanismos de floculación del quitosano en suspensiones microbianas están relacionados con la neutralización de cargas y con la unión entre microorganismos mediante las cadenas poliméricas de este compuesto. No obstante, la contribución relativa de ambos mecanismos está supeditada a las características del polímero, como su grado de desacetilación y su peso molecular, a las características del sustrato o a las características del fango (Kaseamchooung et al., 2006; Strand et al., 2003).

Khemkhao et al. (2011) concluyeron que la neutralización de cargas no fue el mecanismo responsable de la floculación de un fango en suspensión en presencia de quitosano a pH neutro, ya que en ensayos en los que se determinó el potencial zeta en función de diferentes dosis del polímero, no se alcanzó el punto de neutralización de cargas. Por su parte, Hudayah et al. (2016) encontraron que la adición de quitosano modificó la carga superficial negativa de los microorganismos de un fango en suspensión, lo cual favoreció la formación de núcleos para el desarrollo de gránulos. Otros autores han indicado que la aplicación de quitosano incrementa la hidrofobicidad celular, favoreciendo así la adhesión entre los microorganismos (Thaveesri et al., 1995a).

La formación más temprana de gránulos y sus mejores características físicas en los reactores con quitosano pueden atribuirse a una mayor retención de microorganismos en la matriz formada por el polímero. Con el fin de evaluar esta suposición, al finalizar el estudio se caracterizó la morfología de los gránulos mediante microscopía electrónica de barrido. A modo de ejemplo, en las Figura 5.7a y Figura 5.7b se muestran los gránulos formados en los reactores R1 y R3, respectivamente. En todos los casos se observaron gránulos con una estructura rígida y una superficie uniforme. En los gránulos del reactor R3 se observaron formaciones típicas de sustancias poliméricas extracelulares integrando una comunidad microbiana heterogénea con forma de cocos, bacilos y filamentos (Figura 5.7d). En los gránulos del reactor R1 este tipo de sustancias no son evidentes y, si bien también se observó una comunidad microbiana heterogénea, los microorganismos filamentosos parecieron ser menos abundantes. En los gránulos procedentes del reactor con quitosano se puede apreciar una mayor aglomeración de microorganismos de morfología similar al metanógeno *Methanosaeta*, ya sea en forma de bacilos o de filamentos.

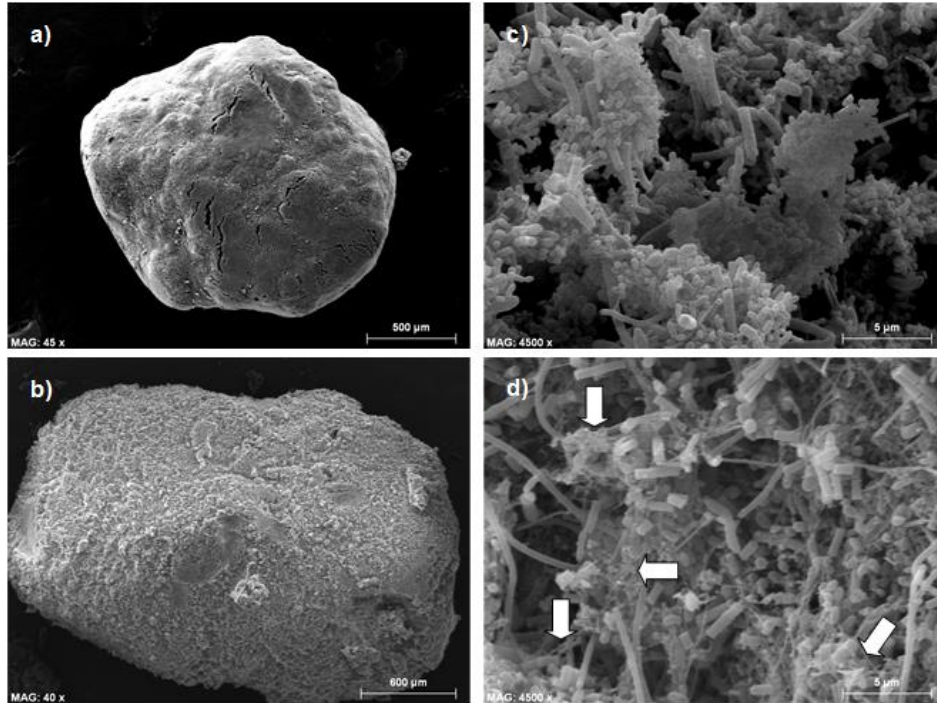


Figura 5.7. Microscopía electrónica de barrido de la morfología de los gránulos al finalizar el estudio: a) Reactor de control (R1), b) Reactor con quitosano (R3), c) Magnificación de los gránulos del reactor R1 (4500x) y d) Magnificación de los gránulos del reactor R3 (4500x).

Producción de sustancias poliméricas extracelulares

Existe un consenso en la bibliografía acerca del papel fundamental que ejercen las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en la formación y la estabilidad de la biomasa granular (Ding et al., 2015). Las proteínas y los polisacáridos son los principales componentes de las EPS; dichos componentes poseen grupos funcionales electronegativos, como el grupo hidroxilo y el grupo carboxilo, que propician la formación de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas que modifican las propiedades superficiales del fango (Sheng et al., 2010; Zhu et al., 2012). Además, las EPS pueden establecer una matriz o red polimérica que favorece la formación de biopelículas mediando en la cohesión y la adhesión entre las células (Schmidt y Ahring, 1994).

En la Tabla 5.6 se presentan los resultados de la variación temporal de la producción de EPS en los tres reactores UASB con sus principales componentes: proteínas (PN) y polisacáridos (PS). En lo que respecta al contenido en polisacáridos, después del periodo de adaptación a la degradación de los disolventes orgánicos, el incremento en la carga orgánica condujo a un aumento significativo en los tres reactores, desde un valor de 5.7 mg g SSV⁻¹ hasta valores entre 14.5 y 17.2 mg g SSV⁻¹, aunque el contenido decreció al finalizar la Fase II. Este comportamiento puede relacionarse con el estrés causado por el incremento en la carga orgánica y el consecuente aumento en la concentración de ácidos grasos volátiles, tal como ha sido observado en otros estudios en los que se ha destacado que las condiciones estresantes en la operación inducen la secreción de EPS (Puñal et al., 2003; Zhou et al., 2006). A partir del día 112 se observó un aumento progresivo del contenido de polisacáridos en el fango de los tres reactores como resultado del incremento sucesivo de la carga orgánica, aunque dicho aumento fue mayor en los reactores con quitosano. Este resultado puede atribuirse a que el incremento en la carga orgánica en estos reactores se efectuó de manera más rápida como consecuencia de su adecuada operación. En el día 219 el contenido de polisacáridos del reactor R1 fue de 11.2 mg g SSV⁻¹, mientras que en los reactores R2 y R3 fue de 24.0 y 20.7 mg g SSV⁻¹, respectivamente.

Tabla 5.6. Sustancias poliméricas extracelulares de las muestras de fango de los reactores UASB tomadas durante la realización del estudio de granulación.

	EPS (mg g SSV ⁻¹)	PS			PN			EPS totales			Relación PN:PS		
		días	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2
Fase I	0	5.7	5.7	5.7	2.4	2.4	2.4	8.1	8.1	8.1	0.4	0.4	0.4
	18	1.4	9.5	2.2	2.3	3.9	4.2	3.8	13.4	6.3	1.6	0.4	1.9
Fase II	54	16.0	14.5	17.2	14.0	40.9	36.8	30.0	55.3	54.0	0.9	2.8	2.1
	89	2.6	4.0	9.2	26.5	49.7	37.4	29.1	53.7	46.5	10.3	12.4	4.1
Fase III	112	7.1	8.2	4.1	19.1	48.4	30.3	26.2	56.6	34.3	2.7	5.9	7.5
	131	7.7	19.8	10.8	49.2	44.8	55.6	56.9	64.6	66.4	6.4	2.3	5.1
	190	8.3	21.1	30.4	81.3	101.9	168.3	89.5	123.0	198.7	9.8	4.8	5.5
	219	11.2	24.0	20.7	94.2	158.2	131.3	105.5	182.3	152.0	8.4	6.6	6.3

EPS: extracellular polymeric substances; sustancias poliméricas extracelulares; PN: proteínas; PS: polisacáridos.

En cuanto al contenido de proteínas de las EPS, éste fue mayor que el contenido de polisacáridos en casi todas las muestras tomadas de los tres reactores (Tabla 5.6). En diversos estudios se ha encontrado una fracción mayor de proteínas que de polisacáridos en las EPS de fangos granulares anaerobios y aerobios (D'Abzac et al., 2010; Ismail et al., 2010; Liu y Fang, 2002; Lu et al., 2015a; Puñal et al., 2003;

Quarmby y Forster, 1995; Schmidt y Ahring, 1994; Zhou et al., 2006), evidenciando diferentes efectos sobre la formación y el mantenimiento de la estabilidad estructural de los agregados. Por ejemplo, Lu et al. (2015a) encontraron que el aumento en la relación proteínas:polisacáridos (PN:PS) contribuyó a la desintegración del fango granular en un reactor UASB alimentado con metanol. Batstone et al. (2004) determinaron que los gránulos con una alta relación PN:PS poseen poca resistencia a las fuerzas de cizalladura y características de sedimentación deficientes. En contraste, en un estudio en el cual se evaluó la distribución de las EPS en la formación de gránulos aerobios, Miksch y Konczak (2012) encontraron que el contenido de proteínas incrementó en un factor de cinco veces el contenido de polisacáridos conforme se formaron los gránulos, y que dicho incremento estuvo directamente relacionado con el aumento de la hidrofobicidad celular. Zhang et al. (2007) también mostraron que el aumento de la relación PN:PS favorece la formación de gránulos, y que las altas relaciones PN:PS propician superficies celulares más hidrofóbicas y con menor carga superficial negativa. Puesto que las proteínas presentan un alto contenido de aminoácidos con carga negativa, la mayor fracción de proteínas en las EPS ocasiona una mayor participación en interacciones de tipo electrostático con cationes multivalentes, reduciendo así la densidad de la carga superficial negativa que rodea las células, y consecuentemente la repulsión electrostática entre éstas, favoreciendo la formación de gránulos y el mantenimiento de la estabilidad estructural de los mismos (Laspidou y Rittmann, 2002; Zhang et al., 2007). De acuerdo con los resultados obtenidos, los tres fangos desarrollados presentaron una relación PN:PS similar al finalizar el estudio, siendo ligeramente superior para el reactor de control: 8.4, 6.6 y 6.3 para los reactores R1, R2 y R3, respectivamente. Schmidt y Ahring (1994) indicaron que en fangos anaerobios alimentados con sustratos metanogénicos y acetogénicos, como el agua residual sintética que se evalúa en este estudio, la producción de polisacáridos es limitada y, por tanto, la producción de proteínas puede desempeñar un papel más importante durante la formación y la estabilidad de los gránulos.

El contenido de proteínas fue superior en los reactores con quitosano respecto al reactor de control, con valores entre 1.1 y 2.9 veces mayores durante las tres fases de operación, excepto en el día 131, en el que el valor obtenido para el reactor R2 fue ligeramente inferior al del reactor R1 (Tabla 5.6). En este estudio, además, se observó el aumento de la producción de las EPS conforme se produjo el aumento en el tamaño de los gránulos en los tres reactores, lo cual sugiere la correlación

entre la excreción de estas sustancias poliméricas y el proceso de granulación. En la Figura 5.8 se muestra el porcentaje de gránulos en los tres reactores en función del contenido de proteínas de las EPS. En esta figura se puede observar la correlación entre estos dos parámetros, con un coeficiente de correlación de 0.8722. En la Fase I, cuando el contenido de proteínas en el fango de los tres sistemas fue bajo, no se observó un aumento significativo en el tamaño de los gránulos. En la Fase II, el aumento del contenido de proteínas en el reactor R3 coincidió con el aumento significativo en el porcentaje de gránulos, mientras que en los reactores R1 y R2, aunque el contenido de proteínas aumentó, siendo considerablemente mayor en el reactor con quitosano, no se observó el aumento del tamaño de los gránulos, lo cual, como se explicó en el apartado anterior, se relacionó con la recirculación continua de partículas finas al interior de estos sistemas. Tras el cambio de configuración de los reactores R1 y R2 al inicio de la Fase III, y la modificación de la estrategia de operación, desde el día 131 en adelante el incremento en la producción de proteínas extracelulares coincidió con el aumento en el porcentaje de gránulos en los tres reactores. Estos resultados concuerdan con las observaciones

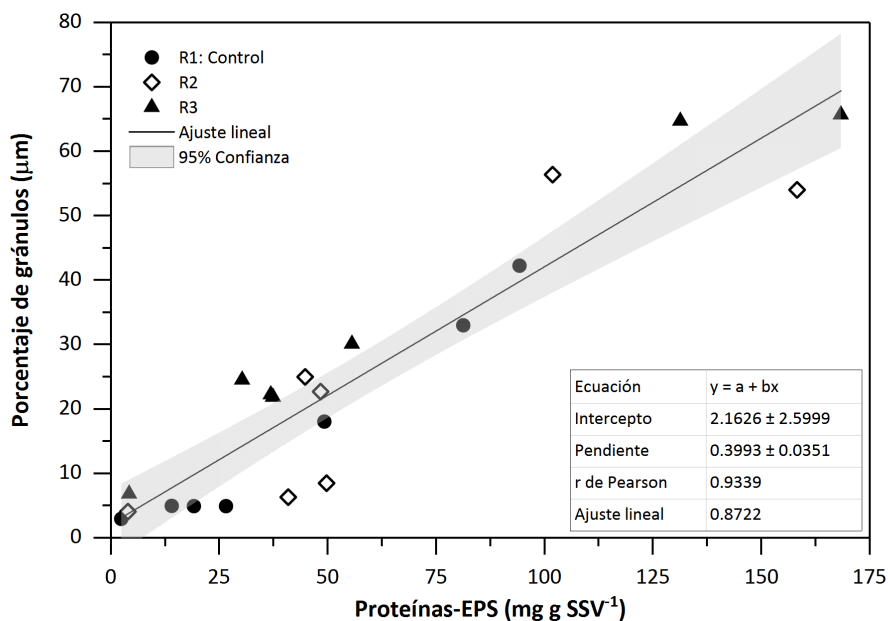


Figura 5.8. Porcentaje de gránulos en función del contenido de proteínas de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

de Zhang et al. (2007), quienes encontraron que el incremento en la producción de proteínas desde un valor de $49.4 \text{ mg g SSV}^{-1}$ en el inóculo, hasta un valor de $148.3 \text{ mg g SSV}^{-1}$, favoreció el proceso de granulación al incrementar la hidrofobicidad de la superficie de las células, y al reducir las fuerzas de repulsión electrostática entre éstas. Los valores del contenido en proteínas obtenidos al finalizar el estudio se encuentran en el intervalo reportado por Batstone et al (2001), entre 138 y $152 \text{ mg g SST}^{-1}$, para fangos granulares de cervecías.

Actividad metanogénica específica y potencial bioquímico de metano

Al finalizar el estudio de granulación con aporte continuo de sustrato orgánico se evaluó la actividad metanogénica específica y el potencial bioquímico de metano del fango granular de cada reactor. En estos ensayos se utilizó como sustrato orgánico la mezcla ternaria de disolventes compuesta por etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol (7:2:1 relación en masa), y cada disolvente de forma individual. La concentración de sustrato orgánico se estableció en 2.5 g DQO L^{-1} y la relación inóculo sustrato en $2.5 \text{ g SSV g DQO}^{-1}$. Todos los ensayos se realizaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

En la Figura 5.9 se presenta el volumen de metano acumulado producido a partir de los sustratos evaluados con el fango de cada reactor UASB. Las curvas muestran una forma típica, con una producción continua de metano hasta que el agotamiento del sustrato orgánico tiene lugar. Para los sustratos evaluados, la producción total de metano ocurrió en menos de 24 horas, excepto para el disolvente 1-etoxi-2-propanol, en cuyo caso la producción de metano cesó tras 9 días desde el inicio de los ensayos, evidenciando la menor biodegradabilidad de este disolvente orgánico. No obstante, no se evidenció una fase de latencia para llevar cabo su degradación, lo cual sugiere que, pese a las bajas concentraciones de 1-etoxi-2-propanol en la corriente de entrada de los reactores UASB, se desarrolló una población de microorganismos capaces de producir las enzimas que dan lugar a la escisión del enlace éter de este disolvente orgánico. De los perfiles de producción de metano acumulado obtenidos a partir del 1-etoxi-2-propanol destaca la conversión del sustrato en dos etapas (Figura 5.9c), determinadas por el cambio de pendiente en las curvas de producción, posiblemente asociadas a las diferentes velocidades a las que tiene lugar la degradación de los productos intermediarios formados a partir de la hidrólisis de este éter de glicol: etanol y acetona. En los ensayos realizados con el fango del reactor R1, la primera etapa presentó una velocidad máxima de producción de metano de $7.0 \pm 0.5 \text{ NmL h}^{-1}$, mientras que con el fango de los reactores R2 y R3, la primera etapa presentó

velocidades ligeramente superiores de 7.6 ± 0.2 y 8.3 ± 0.2 NmL h⁻¹, respectivamente. La segunda etapa presentó velocidades máximas de producción de metano de 2.6 ± 0.2 NmL h⁻¹ en los reactores R1 y R2, y de 3.2 ± 0.2 NmL h⁻¹ para el fango del reactor R3.

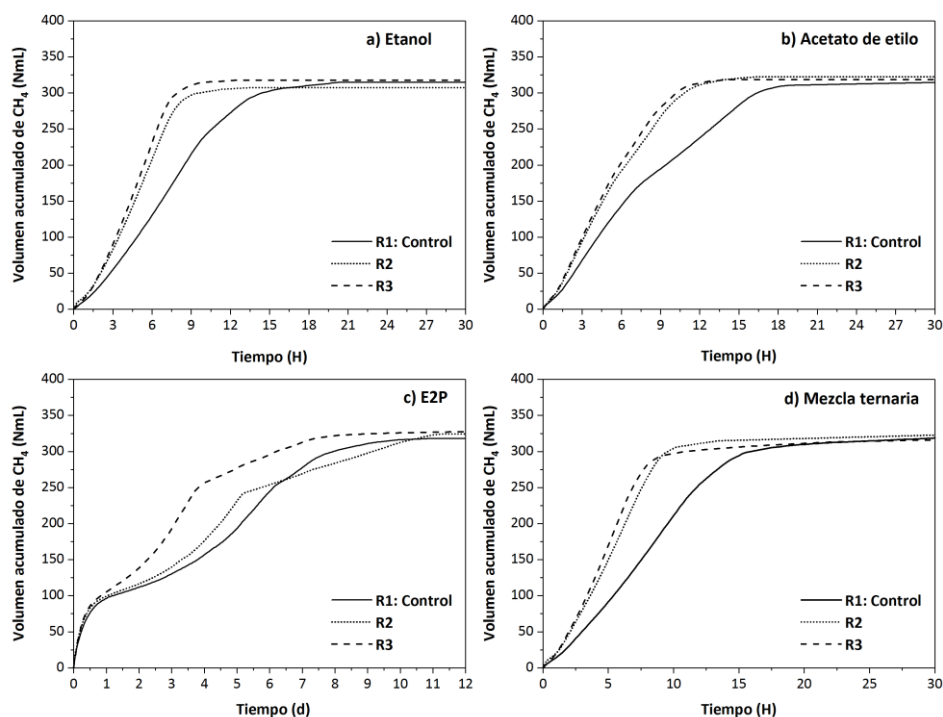


Figura 5.9. Producción de metano acumulado en la degradación de 2.5 g DQO L⁻¹ de: a) etanol, b) acetato de etilo, c) 1-etoxi-2-propanol (E2P) y d) la mezcla ternaria de disolventes orgánicos en relación en masa 7:2:1 para el fango granular de cada reactor.

En la Tabla 5.7 se muestran los resultados correspondientes al potencial bioquímico y la eficacia de recuperación de metano de los ensayos realizados para cada sustrato, esta última definida como el cociente entre el valor de metano obtenido y la producción teórica esperada de 350 NmL. En todos los ensayos se obtuvieron potenciales bioquímicos de metano cercanos al valor teórico (entre 307 y 334 NmL CH₄ g DQO⁻¹) con eficacias de recuperación superiores al 88 %, evidenciando así la conversión a metano del sustrato orgánico alimentado.

Tabla 5.7. Potencial bioquímico de metano y porcentaje de recuperación de metano del fango granular de cada reactor en la degradación de diferentes sustratos orgánicos al finalizar el estudio de granulación.

	Etanol		Acetato de etilo		1-etoxi-2-propanol		Mezcla	
	PBM	ER _{CH₄}	PBM	ER _{CH₄}	PBM	ER _{CH₄}	PBM	ER _{CH₄}
R1	315 ± 5	90 ± 1	314 ± 2	90 ± 1	334 ± 7	95 ± 2	319 ± 4	91 ± 1
R2	307 ± 2	88 ± 1	322 ± 16	92 ± 5	324 ± 8	93 ± 2	323 ± 2	92 ± 1
R3	318 ± 1	91 ± 1	319 ± 16	91 ± 4	328 ± 14	94 ± 4	316 ± 10	90 ± 3

PBM: potencial bioquímico de metano (NmL CH₄ g DQO⁻¹); ER_{CH₄}: eficacia de recuperación de metano (%).

La actividad metabólica de la biomasa anaerobia puede expresarse en términos de la actividad metanogénica específica, una característica importante para describir la calidad de un fango granular (Bhunia y Ghangrekar, 2007; Hulshoff Pol et al., 2004; Show et al., 2004). Los fangos granulares se caracterizan por sus altas actividades metanogénicas, con valores comprendidos entre 0.3 y 2.4 g DQO-CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹, correspondientes a un intervalo entre 105 y 840 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ (Bhunia y Ghangrekar, 2007; Schmidt y Ahring, 1996; Show et al., 2004)¹. En la Tabla 5.8 se presentan los resultados obtenidos para la actividad metanogénica específica. Este parámetro se evaluó como la máxima velocidad específica de producción de metano a partir de las curvas de volumen acumulado.

Tabla 5.8. Actividad metanogénica específica (AME) del fango granular de cada reactor para la degradación de diferentes sustratos orgánicos al finalizar el estudio de granulación.

	AME (NmL CH ₄ g SSV ⁻¹ d ⁻¹)			
	Etanol	Acetato de etilo	1-etoxi-2-propanol	Mezcla
R1	278 ± 8	266 ± 22	67 ± 5	245 ± 3
R2	434 ± 2	370 ± 14	73 ± 2	391 ± 5
R3	489 ± 4	387 ± 16	80 ± 2	440 ± 2

AME: actividad metanogénica específica.

¹ 1 g DQO-CH₄ ocupa 350 NmL en condiciones normales: 273.15 K y 1 atm de presión.

Los valores de actividad metanogénica específica obtenidos con el fango granular de los reactores con quitosano fueron mayores que los obtenidos con el fango granular del reactor de control para todos los sustratos evaluados. Cabe destacar que los valores correspondientes al fango granular del reactor R3 fueron mayores que los del fango del reactor R2, coincidiendo con sus mejores características físicas. En otros estudios se ha reportado que la adición de quitosano mejora la actividad metanogénica específica de fangos granulares. Lafita et al. (2017) obtuvieron una mejora del 6 % en la actividad metanogénica específica de gránulos desarrollados con quitosano en un reactor EGSB, utilizando como sustrato una mezcla de etanol y 1-metoxi-2-propanol (relación másica 5:1). En ensayos llevados a cabo con etanol como fuente de sustrato orgánico, El-Mamouni et al. (1998) reportaron una actividad específica un 7 % superior para los gránulos de un reactor UASB desarrollados con quitosano y adaptados a la degradación de sacarosa, y un 44 % superior para los gránulos adaptados a la degradación de una mezcla de etanol y sacarosa (1:1 relación), respecto a los gránulos de un reactor de control sin quitosano.

En particular, los resultados obtenidos en este estudio para la actividad metanogénica específica con etanol como sustrato, con un valor máximo de 488.6 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ en el reactor R3, fueron mayores que otros reportados en la bibliografía para fangos granulares en condiciones mesofílicas subóptimas de temperatura y adaptados a la degradación de este sustrato. Por ejemplo, Lafita et al. (2015) reportaron una actividad metanogénica de 214.5 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ para un fango granular adaptado a la degradación de un agua residual sintética contaminada con etanol y 1-metoxi-2-propanol a 25 °C. Vermorel (2017) obtuvo un valor muy similar, de 212 ± 4 mL CH₄ g SSV d⁻¹, para la degradación de etanol con un fango granular adaptado a la degradación de disolventes orgánicos de la industria flexográfica. Los resultados indican que la adición de quitosano mejoró considerablemente la velocidad de degradación del etanol, lo cual podría relacionarse con una conformación estructural diferente de los gránulos que permitiría mejorar la transferencia de metabolitos entre microorganismos, en este caso, la transferencia de hidrógeno (Hulshoff Pol et al., 2004; Stams et al., 2012).

Respecto a la degradación del acetato de etilo, tal como se indicó en el apartado 1.4, este compuesto podría transformarse siguiendo el mecanismo de degradación de otros ésteres de metilo en etanol y en ácido acético, que posteriormente se convierten en metano (Yanti et al., 2014). La actividad

metanogénica específica obtenida con el acetato de etilo fue inferior a la obtenida con el etanol en los tres sistemas. Por ello, la etapa para convertir el acetato de etilo a etanol y a ácido acético sería la etapa limitante de su degradación anaerobia. No obstante, los resultados muestran que el acetato de etilo es un sustrato orgánico fácilmente biodegradable, como se ha señalado en otros estudios conducidos en reactores de alta carga operando con tiempos de retención bajos (entre 10 y 48 horas), en los que la degradación de este disolvente orgánico fue superior al 97 % (Henry et al., 1996; Lafita, 2016).

Los valores de actividad metanogénica específica obtenidos para la degradación del 1-etoxi-2-propanol fueron significativamente más bajos que los valores correspondientes al etanol y al acetato de etilo (en un orden de aproximadamente 5 veces menor), indicando su menor biodegradabilidad anaerobia. Vermorel (2017) evaluó la actividad metanogénica específica de un fango granular adaptado a la degradación de disolventes orgánicos de la industria flexográfica, que se mantuvo almacenado durante 1.5 años a 4 °C. En su estudio fueron necesarios 7 ± 1 días desde el inicio del ensayo para que los microorganismos comenzaran a degradar el sustrato, y se obtuvo una actividad metanogénica específica de 32 ± 1 mL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹. La fase de latencia necesaria para la degradación del sustrato se atribuyó al periodo que permaneció el fango sin la exposición a este disolvente orgánico, que estaría relacionada con una pérdida de la actividad enzimática cuando la biomasa no está expuesta al sustrato (Lafita et al., 2015). Aunque en los ensayos realizados en el presente estudio no se observó una fase de latencia, la baja actividad metanogénica específica del 1-etoxi-2-propanol respecto a los otros disolventes evaluados y el tiempo prolongado —del orden de días— requerido para su degradación, sugieren que la etapa limitante para la conversión a metano de este compuesto orgánico sería la escisión del enlace éter. Los valores de actividad metanogénica específica obtenidos con el fango granular de los reactores con quitosano fueron entre un 9 y un 17 % superiores a los obtenidos con el fango del reactor de control. Estos resultados son coherentes con la mayor eficacia de eliminación del 1-etoxi-2-propanol en ambos sistemas durante la realización del estudio (Figura 5.5).

En el caso de la mezcla ternaria, los valores de actividad metanogénica son muy similares (aproximadamente un 90 % en todos los reactores) a los valores obtenidos en la degradación del etanol para los tres fangos granulares. Este hecho parece indicar que la presencia de los disolventes orgánicos en menor proporción, acetato

de etilo y 1-etoxi-2-propanol, no afectó a la velocidad de conversión del etanol, principal componente de la mezcla ternaria. De acuerdo con el perfil de producción de metano, Figura 5.9d, la degradación de los componentes de la mezcla parece llevarse a cabo de forma simultánea, es decir, no se observó una producción por etapas que pueda asociarse a diferentes velocidades de consumo de los disolventes secundarios.

5.2.4 Análisis de las comunidades microbianas

La formación de biomasa granular es un proceso complejo que involucra factores microbiológicos y fisicoquímicos. La presencia y la abundancia de poblaciones de microorganismos en un fango granular depende de las características y de la concentración del sustrato alimentado, de las condiciones de operación del reactor y de las condiciones ambientales del proceso. El análisis de las comunidades microbianas partícipes en la degradación de un sustrato específico y en la formación de biomasa granular aporta información valiosa sobre las capacidades y las limitaciones de los gránulos que, finalmente, determinan el rendimiento y la viabilidad del proceso de degradación. A continuación, se presentan y se discuten los resultados correspondientes al análisis de las comunidades microbianas de las muestras de fango de los reactores UASB extraídas durante el transcurso del estudio. Para llevar a cabo este análisis se aplicaron dos técnicas de biología molecular: DGGE y secuenciación masiva o de alto rendimiento.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

En la Figura 5.10 se presentan los perfiles de bandas obtenidos en la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de las poblaciones de bacterias (Figura 5.10a) y arqueas (Figura 5.10b) de las muestras de biomasa tomadas de cada reactor durante el estudio. En esta figura se indican las bandas extraídas del gel para su secuenciación e identificación. En la Tabla 5.9 se presenta la identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas de las bandas extraídas del gel, junto con el número de acceso, la similitud de las secuencias en relación con las de la base de datos GenBank y su afiliación filogenética.

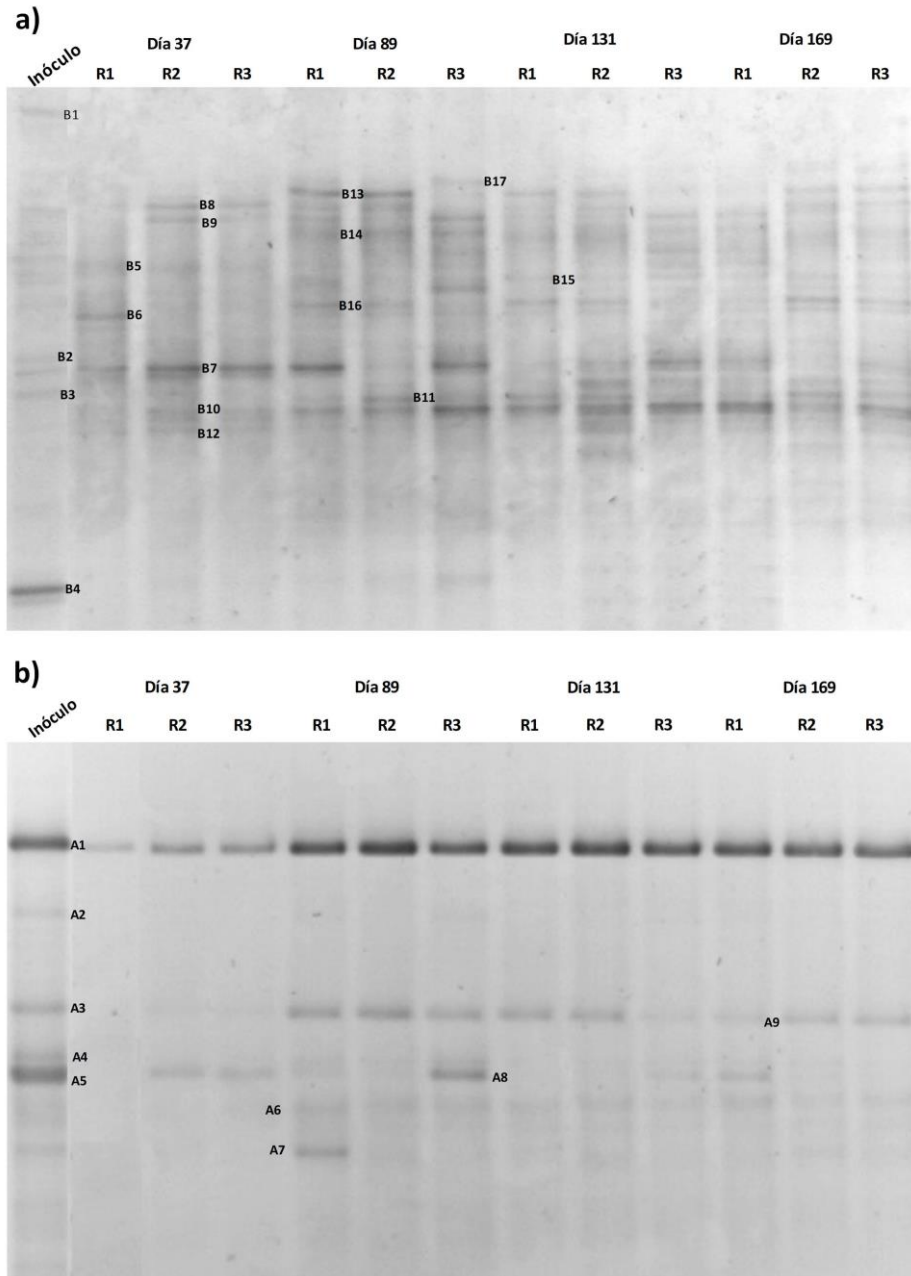


Figura 5.10. Variación temporal de los perfiles de DGGE de la biomasa extraída de los tres reactores a) DGGE de bacterias y b) DGGE de arqueas.

Tabla 5.9. Identificación, porcentaje de similitud y afiliación filogenética de las bandas de bacterias y arqueas aisladas y secuenciadas de los perfiles de DGGE

Banda	Microorganismo más cercano	Número de acceso	PS %	Grupo filogenético
B1	<i>Paludibaculum fermentans</i>	NR_134120.1	95	<i>Bacteroidetes/Bacteroidales</i>
B2	<i>Catalinimonas niigatensis</i>	NR_1333994.1	92	<i>Acidobacteria</i>
B3	<i>Hydrogenophaga luteola</i>	NR_145548.1	100	<i>Proteobacteria/Burkholderiales</i>
B4	<i>Desulfovirgula thermocuniculi</i>	NR_043640.1	88	<i>Firmicutes/Thermoanaerobacteriales</i>
B5	<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	NR_043063.1	94	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriales</i>
B6	<i>Flavobacterium aquaticum</i>	NR_108893.1	96	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriales</i>
B7	<i>Geobacter psychrophilus</i>	NR_043075.1	95	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B8	<i>Clostridium limosum</i>	NR_104825.1	90	<i>Firmicutes/Clostridiales</i>
B9	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	NR_113564.1	88	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriales</i>
B10	<i>Pelobacter propionicus</i>	NR_074975.1	93	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B11	<i>Smithella propionica</i>	NR_024989.1	92	<i>Proteobacteria/Syntrophobacteriales</i>
B12	<i>Treponema caldarium</i>	NR_074757.1	91	<i>Spirochaetes/Spirochaetales</i>
B13	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	NR_044777.1	92	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriales</i>
B14	<i>Flavobacterium branchiicola</i>	NR_145953.1	85	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriales</i>
B15	<i>Trichococcus pasteurii</i>	NR_036793.2	98	<i>Firmicutes/Lactobacillales</i>
B16	<i>Geobacter chapellei</i>	NR_025982.1	95	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B17	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	NR_044777.1	92	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriales</i>

Tabla 5.7. (Continuación) Identificación, porcentaje de similitud y afiliación filogenética de las bandas de bacterias y arqueas aisladas y secuenciadas de los perfiles de DGGE

Banda	Microorganismo más cercano	Número de acceso	PS %	Grupo filogenético
A1	<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	NR_074173.1	100	<i>Methanomicrobiales/Methanocorpusculaceae</i>
A2	<i>Methanospirillum hungatei</i>	NR_074177.1	79	<i>Methanomicrobiales/Methanospirillaceae</i>
A3	<i>Methanosaeta concilii</i>	NR_102903.1	100	<i>Methanosarcinales/Methanosaetaceae</i>
A4	<i>Methanosaeta thermophila</i>	NR_074214.1	96	<i>Methanosarcinales/Methanosaetaceae</i>
A5	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	NR_043203.1	99	<i>Methanosarcinales/Methanosaetaceae</i>
A6	<i>Methanobacterium beijingense</i>	NR_028202.1	99	<i>Methanobacteriales/Methanobacteriaceae</i>
A7	<i>Methanosarcina mazei</i>	NR_041956.1	100	<i>Methanosarcinales/Methanosarcinaceae</i>
A8	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	NR_043203.1	98	<i>Methanosarcinales/Methanosaetaceae</i>
A9	<i>Methanosaeta concilii</i>	NR_102903.1	100	<i>Methanosarcinales/Methanosaetaceae</i>

PS: Porcentaje de similitud.

Respecto al análisis de las poblaciones de bacterias, se aislaron, secuenciaron e identificaron un total de 17 bandas del gel, de las cuales 4 corresponden al inóculo (B1, B2, B3 y B4) y 13 a las muestras tomadas de los tres reactores durante el estudio. De acuerdo con la Figura 5.10a, se observó un cambio en la diversidad de las poblaciones de bacterias en los tres reactores en relación con las poblaciones presentes en el inóculo. De las bandas observadas en el inóculo, sólo la banda B7 permaneció en los reactores durante las diferentes fases de operación. Este cambio puede atribuirse a la diferencia en el sustrato alimentado y a las condiciones operacionales y ambientales de este estudio en comparación con las aplicadas en el digestor anaerobio del cual procedía el inóculo. Además, el perfil de bandas muestra que, aunque en los tres reactores se desarrolló una estructura de comunidades bacterianas similar, algunas bandas aparecen antes y en menor o mayor intensidad según el reactor. Este hecho podría relacionarse con la respuesta de los sistemas a las condiciones de operación impuestas, como la carga orgánica o la concentración de disolventes aplicada, parámetros que pudieron influir en la estructura de las comunidades de bacterias. A modo de ejemplo, si bien en el día 89 en los tres reactores parecen estar presentes las mismas bandas, su intensidad es diferente. En el reactor R3, el cual operaba a una carga orgánica mayor que el reactor de control, la banda B10 aparece con mayor intensidad, mientras que la intensidad de la banda B13 es muy baja. Asimismo, en el reactor R2 la banda B11 es más intensa en este día que en los reactores R1 y R3. Los resultados del día 169 muestran que el patrón de bandas es similar en los tres reactores, aunque en el reactor de control las bandas B16 y B17 parecen haber desaparecido, mientras que en los reactores con quitosano están presentes. Estas diferencias pueden atribuirse a la aplicación de condiciones de operación diferentes en estos reactores durante el periodo que corresponde al día de interés (carga orgánica, carga hidráulica y velocidad ascensional).

Las secuencias del gen ARNr 16S de las 13 bandas de bacterias predominantes en los reactores pertenecen a cuatro filos comúnmente presentes en reactores anaerobios: *Proteobacteria* (4), *Bacteroidetes* (6), *Firmicutes* (2) y *Spirochaetes* (1) (Narihiro et al., 2009; O'Reilly et al., 2010). Todas las bandas pertenecientes al filo *Proteobacteria* presentaron similitud con microorganismos de la clase *Deltaproteobacteria*. Las especies que se agrupan en esta clase son conocidas por su capacidad para realizar un metabolismo sintrófico (McInerney et al., 2008; Sieber et al., 2012). Las bandas B7 y B16, que corresponden a *Geobacter psychrophilus* y *Geobacter chappellei*, se observaron en los tres reactores. Estos microorganismos pueden oxidar sustratos como etanol, acetato, formiato o lactato a partir de la

reducción de óxidos de hierro o manganeso (Coates et al., 2001; Nevin et al., 2005). Se ha reportado que algunas especies del género *Geobacter* pueden realizar conexiones eléctricas con aceptores extracelulares de electrones y con otros microorganismos —como *Methanosaeta*— mediante el mecanismo sintrófico de transferencia directa de electrones entre especies o DIET por sus siglas en inglés (Direct interspecies electron transfer), en medios en los que el etanol constituye la fuente principal de sustrato o representa una fracción importante del mismo (Shen et al., 2016; Shrestha et al., 2014; Xing et al., 2017). El mecanismo de DIET es un metabolismo sintrófico en el que los electrones fluyen entre células a través de apéndices celulares (pili), citocromos, minerales o carbón abiótico (carbón activado), diferente a otros mecanismos en los que los microorganismos intercambian electrones mediante transportadores solubles como el hidrógeno o el formiato (Lovley, 2017; Shen et al., 2016). En estudios recientes, se ha señalado que este mecanismo puede ser una ruta potencial para la producción sintrófica de metano en gránulos de reactores anaerobios alimentados con aguas residuales que contienen etanol (Morita et al., 2011; Rotaru et al., 2014; Shrestha et al., 2014; Zhao et al., 2016).

La banda B10 corresponde a *Pelobacter propionicus*, un microorganismo capaz de producir ácido propiónico y acetato a partir de la fermentación del etanol (Schink et al., 1987). Las especies del género *Pelobacter* pueden participar, además, en la oxidación de alcoholes primarios y de dioles en asociación sintrófica con microorganismos hidrogenotróficos mediante el mecanismo de transferencia de hidrógeno entre especies (Schink, 2006; Shen et al., 2016). La especie *Smithella propionica*, correspondiente a la banda B11, puede convertir el propionato a acetato y a butirato en sintrofia con microorganismos metanogénicos consumidores de hidrógeno o de formiato (Liu et al., 1999). El butirato, que se produce en pequeñas cantidades en comparación con el acetato, también puede ser lentamente degradado hasta acetato por este microorganismo (Liu et al., 1999; Stams et al., 2001). Como aspecto interesante a destacar, los microorganismos descritos anteriormente, involucrados en la producción y consumo de ácidos grasos volátiles, no se observaron en el inóculo. La intensidad de las bandas que les representan, especialmente la banda B10, aumentó conforme la formación de gránulos tuvo lugar, y fueron detectados antes en los reactores con quitosano: en el día 37 en los reactores R2 y R3 frente al día 89 en el reactor R1.

La banda B12 presentó una similitud alta con el microorganismo *Treponema caldarium*. Las bacterias del género *Treponema* han sido descritas como posibles homoacetógenos (Zhang et al., 2009). Aunque este microorganismo se identificó en todos los reactores, su intensidad fue baja en comparación con las especies de *Pelobacter* y *Smithella*. Este hecho sugiere que el hidrógeno producido en los sistemas fue utilizado principalmente en asociaciones sintróficas con microorganismos hidrogenotróficos. El filo *Firmicutes* estuvo representado por las bandas B8 y B15. La banda B8 se relacionó con el género *Clostridium*, bacterias fermentativas cuya presencia es común en ambientes metanogénicos (Diaz et al., 2006). La banda B15 presentó similitud con *Trichococcus pasteurii*, un microorganismo fermentativo aerotolerante que utiliza glucosa, lactato, acetato y formiato, entre otros ácidos, y que ha sido encontrado en reactores anaerobios operados a baja temperatura (Bialek et al., 2014). Aunque la intensidad de la banda B15 fue baja, indicando una menor abundancia de éste microorganismo, su presencia pudo estar favorecida en los tres reactores debido a la temperatura mesofílica subóptima a la que se llevó a cabo el estudio (23.7 ± 1.4 °C). Por su parte, las bandas correspondientes al filo *Bacteroidetes* presentaron similitud con el género *Capnocytophaga* (B5, B9, B13 y B17) y *Flavobacterium* (B6 y B14), ambos pertenecientes a la familia *Flavobacteriales*. Estas bacterias, que se caracterizan por ser anaerobias facultativas, han sido encontradas en reactores anaerobios que tratan sustratos acidogénicos o en fangos de depuradoras municipales (Li et al., 2016; Maspolim et al., 2015; Zhao et al., 2016).

En la Figura 5.10b se presentan los perfiles de bandas obtenidos en el análisis de las poblaciones de arqueas del inóculo y de las muestras de fango de los reactores UASB tomadas durante el estudio. Se aislaron, secuenciaron e identificaron un total de 9 bandas. Las secuencias del gen ARNr 16S de los microorganismos que representan dichas bandas pertenecen a los órdenes *Methanomicrobiales* (2), *Methanosarcinales* (6) y *Methanobacteriales* (1), los órdenes de arqueas metanogénicas más comunes en ambientes anaerobios (Stams y Plugge, 2009). En el inóculo se identificaron 5 bandas: A1, A2, A3, A4 y A5, de las cuales todas, excepto la banda A4, se observaron en los tres reactores durante el estudio. No obstante, las muestras de los reactores con quitosano presentaron algunas diferencias con las del reactor de control. Así, en la Figura 5.10b se observa que tras 37 días de operación, las bandas que representan las poblaciones de arqueas tuvieron una intensidad mayor en los reactores inoculados con quitosano que en el reactor de control. Concretamente, la intensidad de las bandas A3, A5 y A8 fue casi

imperceptible en el reactor de control en el día 37, mientras que en los reactores con quitosano estas bandas parecen tener una mayor intensidad. En el día 89, la intensidad de las bandas en la muestra del reactor de control aumentó, indicando la adaptación de las comunidades de arqueas a las condiciones impuestas durante las fases de operación I y II. Las bandas A3, A5 y A8 se identificaron como especies del género *Methanosaeta* (Tabla 5.9). Como se indicó en los apartados 2.1 y 2.2, las arqueas del género *Methanosaeta* son metanógenos acetotróficos ampliamente descritos en la bibliografía como microorganismos clave en la formación de gránulos, el desarrollo de agregados y la estabilización de la estructura granular, ya que actúan como centros de nucleación o forman una red de filamentos que propicia la unión entre microorganismos (Gagliano et al., 2017; Hulshoff Pol, 1989; Hulshoff Pol et al., 2004; Macleod et al., 1990). La adición de quitosano podría haber contribuido a la retención de microorganismos metanogénicos, favoreciendo la formación temprana de gránulos mediante la prevalencia de *Methanosaeta* durante las primeras semanas de operación. Esto a su vez podría relacionarse con el mayor rendimiento que se observó en estos reactores durante las fases de operación I y II, con eficacias de eliminación mayores y un consumo más eficiente de los ácidos grasos volátiles en comparación con el reactor de control. Khemkhao et al. (2011) obtuvieron resultados similares en un reactor UASB empleado para el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria del aceite de palma. En el estudio conducido por estos autores, el análisis de las comunidades microbianas mediante DGGE reveló que el reactor con el polímero tenía una mayor diversidad de metanógenos del género *Methanosaeta* que el reactor de control y que, además de la mejora del proceso de granulación en este reactor, la producción de biogás fue mayor y la pérdida de biomasa en el efluente se redujo entre un 6 y un 23 %.

Como se mencionó previamente, en estudios recientes se ha señalado que el mecanismo de transferencia directa de electrones entre especies de los géneros *Geobacter* y *Methanosaeta* puede ocurrir en reactores anaerobios utilizados para el tratamiento de aguas residuales con un alto contenido en etanol, como las aguas residuales de la industria cervecera (Morita et al., 2011; Rotaru et al., 2014; Shrestha et al., 2014; Xing et al., 2017; Zhao et al., 2016). Se puede destacar el estudio de Morita et al. (2011) en el que se evaluaron los mecanismos de transferencia de electrones en los gránulos de un reactor UASB que trataba un agua residual sintética compuesta por etanol, acetato y propionato como fuentes de carbono orgánico. Al incubar los gránulos procedentes del reactor con los sustratos que son posibles intermediarios en la degradación sintrófica del etanol como el H₂,

el formiato y el acetato, la máxima velocidad de producción de metano fue nula o más baja que la velocidad de producción de metano a partir de etanol. Este hecho indica que un mecanismo diferente al mecanismo de transferencia de hidrógeno o formiato entre especies tuvo lugar durante la degradación de este compuesto. Estos autores sugirieron que el mecanismo podría ser el DIET, ya que se encontró que los gránulos eran conductores eléctricos y que *Geobacter* y *Methanosaeta* predominaban en ellos. Rotaru et al. (2014) reportaron el primer estudio en el que se demostró que un metanógeno, *Methanosaeta harundinacea*, podía participar en el mecanismo DIET. Los resultados obtenidos en co-cultivos de *Geobacter metallireducens* y *M. harundinacea* indicaron que la arquea metanogénica era capaz de aceptar los electrones transferidos por *G. metallireducens* para efectuar la reducción del dióxido de carbono a metano. Estos resultados son reveladores, ya que anteriormente se consideraba que *Methanosaeta* sólo utilizaba acetato para la formación de metano. No obstante, las secuencias del genoma de las especies de *Methanosaeta* han demostrado contener genes que codifican las enzimas requeridas para realizar la ruta de reducción del dióxido de carbono (Lovley, 2017; Shrestha et al., 2014; Smith y Ingram-Smith, 2007). En el presente estudio, la presencia de ambos géneros en los agregados de los tres reactores, y el hecho de que el etanol fuera el principal disolvente en el agua sintética alimentada, así como un posible compuesto intermediario en la degradación del acetato de etilo y del 1-etoxi-2-propanol, sugieren que el mecanismo DIET pudo tener lugar en los sistemas estudiados.

La banda predominante en el gel de DGGE de arqueas en todas las muestras evaluadas fue la banda A1, cuya secuencia presentó una similitud 100 % idéntica con el microorganismo hidrogenotrófico *Methanocorpusculum labreanum*. Este microorganismo presenta velocidad máxima de crecimiento a una temperatura de 37 °C y utiliza hidrógeno o formiato-CO₂ para la producción de metano, pero de acuerdo con Zhao et al. (1989), es incapaz de utilizar otros sustratos como etanol o acetato. Especies del género *Methanocorpusculum* han sido relacionadas con el proceso de granulación en reactores anaerobios operados a bajas temperaturas (O'Reilly et al., 2009; O'Reilly et al., 2010). La presencia de este microorganismo en el fango utilizado como inóculo y la temperatura mesofílica subóptima del experimento favorecieron su predominancia en los tres reactores.

La banda A2 se identificó como *Methanospirillum hungatei*. Se trata de un metanógeno hidrogenotrófico que ha sido asociado con especies del género

Pelobacter en la degradación sintrófica de alcoholes primarios y dioles (Eichler y Schink, 1985), y con *Smithella propionica* en la degradación sintrófica de propionato (Stams et al., 2012). Ese microorganismo se observó en el inóculo, pero no así en las muestras de biomasa tomadas durante el trascurso del experimento, pese a que el etanol fue la principal fuente de sustrato orgánico en el agua residual sintética de interés y a que *Pelobacter* y *Smithella* estuvieron presentes. Las condiciones operacionales y la predominancia de otros microorganismos hidrogenotróficos pertenecientes al orden *Methanomicrobiales*, como *Methanocorpusculum*, pueden ser las causas de la desaparición de *Methanospirillum* en los sistemas.

La banda A6 fue identificada como *Methobacterium beijingense*, el único microorganismo del orden *Methanobacteriales* que se observó en los reactores a partir del día 89. *Methobacterium beijingense* fue aislado del fango de un reactor UASB utilizado para la depuración de aguas residuales de cervecería (Ma et al., 2005) y se ha identificado en reactores anaerobios alimentados con aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos como fenol o tricloroetileno en un amplio intervalo de temperatura —15-37 °C— (C. L. Chen et al., 2008; Siggins et al., 2011b).

Además de *Methanosaeta*, tras 89 días de operación se observó otro metanógeno acetotrófico de la familia *Methanosarcinaceae* en el reactor de control, concretamente *Methanosarcina mazei* (A7), aunque en las muestras posteriores no se detectó. Las especies del género *Methanosarcina* pueden competir con especies del género *Methanosaeta* según la concentración de acetato en el reactor, mostrando predominancia a concentraciones altas (Conklin et al., 2006; McMahon et al., 2001; Wiegant, 1987). *Methanosarcina* sp., además, son microorganismos versátiles que pueden utilizar otros sustratos para su crecimiento, como metanol, compuestos metilados y H₂-CO₂ (Liu et al., 1985; Liu y Whitman, 2008). Si bien el reactor de control se presentaron picos eventuales de ácidos grasos volátiles después del día 89, la concentración media fue inferior a 200 mg L⁻¹, lo cual pudo propiciar el predominio de *Methanosaeta* sobre *Methanosarcina*.

Secuenciación de alto rendimiento

Las muestras de biomasa correspondiente al inóculo y al fango granular de los tres reactores UASB del día 169 se analizaron mediante secuenciación de alto rendimiento. En la Figura 5.11 se presentan los resultados de la estructura de las

comunidades microbianas de las muestras a nivel de filo, de los filios con una abundancia relativa superior al 1 % en al menos una de las muestras analizadas.

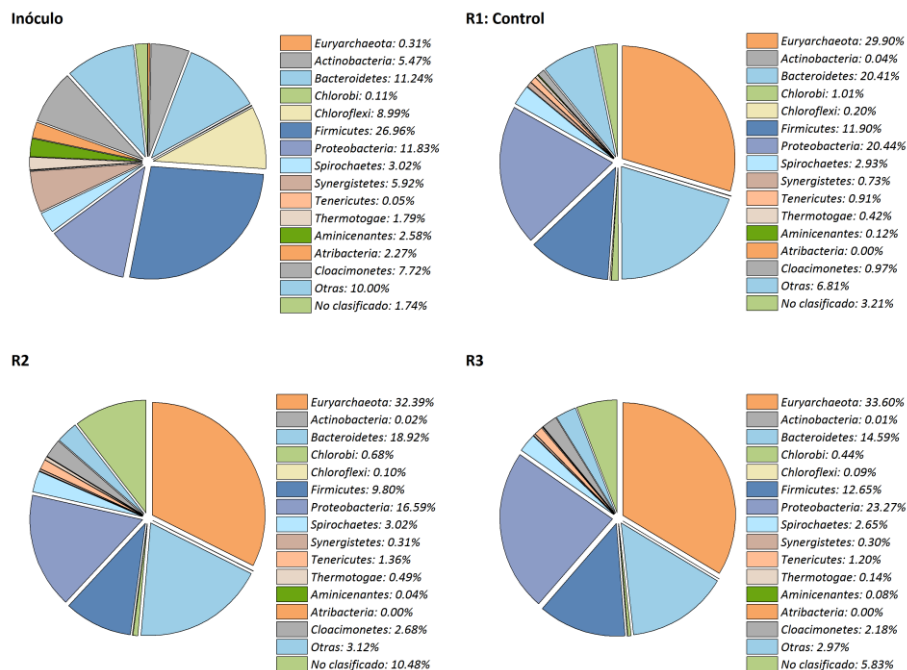


Figura 5.11. Estructura microbiana de la muestra correspondiente al inóculo y de las muestras de los tres reactores UASB en el día 169 a nivel de filo.

Los filios predominantes incluyen a *Euryarchaeota*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Spirochaetes* y *Cloacimonetes*. Los resultados evidencian el cambio estructural de las comunidades microbianas de los tres reactores UASB respecto a las comunidades microbianas del inóculo. En las muestras de los tres sistemas destaca el aumento de la abundancia relativa del filo *Euryarchaeota* —que incluye a los microorganismos metanogénicos— desde un valor del 0.3 % en el inóculo hasta valores del 32.4 y 33.6 % en la biomasa granular de los reactores con quitosano, R2 y R3, respectivamente, y del 29.9 % en la biomasa del reactor de control. Los resultados muestran, además, una estructura similar en los tres reactores asociada a la alimentación de un agua residual sintética con la misma composición y en concentraciones similares. La abundancia relativa de filios del dominio Bacteria presentes en el inóculo, como *Firmicutes*, disminuyó, y filios como *Actinobacteria* y *Chloroflexi*, con abundancias superiores al 5 % en el

inóculo, casi desaparecieron en los sistemas tras 169 días de operación. Por el contrario, la abundancia del filo *Proteobacteria*, que incluye la clase *Deltaproteobacteria* y a bacterias capaces de realizar el metabolismo sintrófico necesario para la degradación anaerobia del etanol, aumentó significativamente desde un valor del 11.8 % en el inóculo a valores del 20.4, 16.6 y 23.3 % en los reactores R1, R2 y R3, respectivamente. Xing et al. (2017) reportaron la predominancia de los fillos *Euryarchaeota* (27.4 %) y *Proteobacteria* (45.9 %) en el fango de un reactor ASBR adaptado a la degradación de etanol.

En la Figura 5.12 se presenta la estructura microbiana de los géneros predominantes con una abundancia relativa superior al 0.1 % en al menos una de las muestras analizadas. En esta figura se observa que algunos géneros presentes en el inóculo como *Coprothermobacter*, *Clostridium*, *Anaerobaculum* y *W5*, con una abundancia relativa del 5.1, 1.3, 3.0 y 6.3 %, respectivamente, no prevalecieron en la población de bacterias del fango granular de los reactores UASB. En contraste, otros géneros como *Geobacter*, cuya abundancia relativa fue tan baja como 0.2 % en el inóculo, incrementaron su abundancia tras 169 días de operación, con valores de hasta 5.2 y 7.3 % en el fango granular de los reactores con quitosano, R2 y R3, y del 4.2 % en el reactor de control. La abundancia relativa del género *Syntrophus* también aumentó en los tres sistemas, desde un valor del 0.1 % en el inóculo, hasta valores entre el 1.0 y el 3.4 %. Este género pertenece a la familia *Syntrophaceae*, al igual que el género *Smithella*, el cual se identificó en las muestras mediante DGGE. Las especies del género *Syntrophus* se caracterizan por ser capaces de degradar de manera sintrófica compuestos aromáticos y ácidos grasos volátiles de cadena media y de cadena larga (McInerney et al., 2008; Stams et al., 2012). Aunque en menor abundancia que *Geobacter*, el género *Pelobacter* también fue detectado en los tres reactores. En el reactor de control se detectaron bacterias del género *Desulfovibrio* con una abundancia relativa del 4.6 %, pero su abundancia relativa fue menor en los reactores R2 y R3 con valores del 2.7 y 2.6 %, respectivamente. Las especies del género *Desulfovibrio*, además de crecer en asociación sintrófica con metanógenos hidrogenotróficos como *Methanobacterium* para la degradación de etanol o lactato (Bryant et al., 1977; Shen et al., 2016; Thiele y Zeikus, 1988), pueden oxidar el etanol o el hidrógeno para la reducción del sulfato (Hao et al., 2014; Hu et al., 2015). La predominancia del género *Desulfovibrio* se ha reportado en gránulos de reactores de alta carga utilizados para el tratamiento de aguas residuales de cervecerías y aguas residuales sintéticas contaminadas con etanol (Shrestha et al., 2014; Xing et al., 2017). Otro género identificado en los tres reactores, pero no en el inóculo,

fue el género *Acetobacterium*. Las especies de este género se caracterizan por poseer un metabolismo homoacetogénico (Willems y Collins, 1996), y se ha demostrado su capacidad para realizar la escisión del enlace éter en éteres de glicol (Schramm y Schink, 1991) y la degradación de ésteres de metilo (Liu y Suflita, 1994).

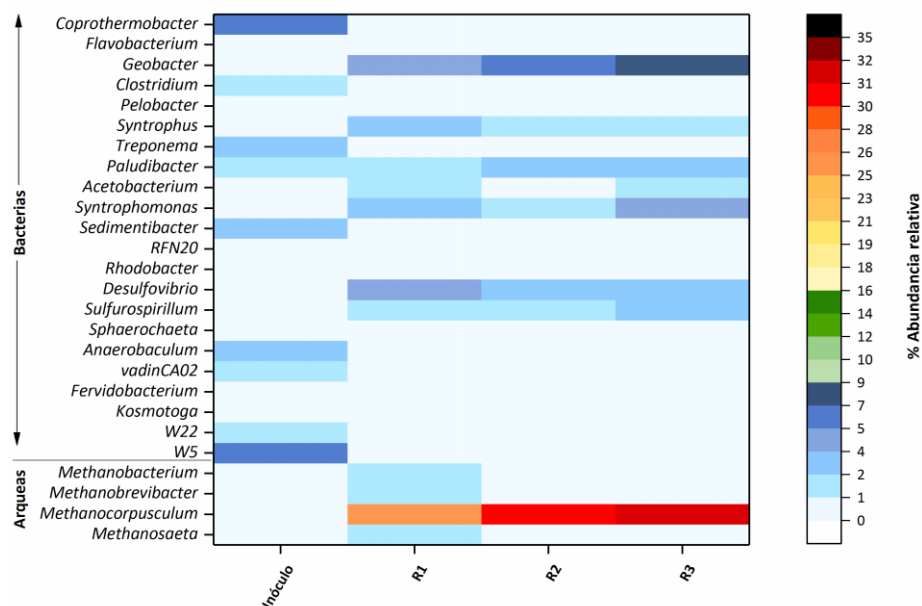


Figura 5.12. Heat map de los géneros con una abundancia relativa >0.1 % en al menos una de las muestras de biomasa evaluadas: el inóculo y las muestras de biomasa de los tres reactores UASB en el día 169.

La identificación de las comunidades de bacterias mediante secuenciación de alto rendimiento demostró la predominancia de microorganismos sintróficos, cuya abundancia estuvo determinada por el agua residual alimentada a los reactores, compuesta principalmente por etanol, sustrato que además es un posible intermediario en la degradación de los otros disolventes, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol. La importancia de las comunidades sintróficas en reactores anaerobios de alta carga y la formación de agregados para que las interacciones sintróficas se ejecuten de manera más eficiente ha sido ampliamente destacada en la bibliografía (Schmidt y Ahring, 1996; Stams et al., 2012; Stams y Plugge, 2009). La formación de biomasa granular reduce la distancia entre bacterias y metanógenos favoreciendo la transferencia de metabolitos, lo cual resulta en altas velocidades de conversión del sustrato orgánico (Hulshoff Pol et al., 2004; Stams et al., 2012).

Respecto a las comunidades de arqueas, los resultados de la secuenciación de alto rendimiento fueron consistentes con los resultados obtenidos mediante DGGE, siendo los géneros predominantes en la muestra correspondiente al inóculo y a los reactores: *Methanobacterium*, *Methanocorpusculum* y *Methanosaeta*. Los resultados también mostraron la presencia del género *Methanobrevibacter* en los reactores. En la Figura 5.12 se puede observar el aumento de la abundancia relativa de estos microorganismos en los gránulos tras 169 días de operación. *Methanocorpusculum* fue el género más abundante con valores del 25.3, 30.1 y 31.7 % en el fango granular de los reactores R1, R2 y R3, respectivamente. La abundancia de este microorganismo hidrogenotrófico en los tres sistemas muestra su importancia en el tratamiento de un agua residual sintética contaminada con la mezcla de disolventes orgánicos de interés en este estudio, utilizando un fango en suspensión como inóculo. Los otros géneros de arqueas alcanzaron una abundancia relativa entre el 0.5 y el 1.5 % en todos los reactores.

En un estudio reciente, Bravo et al. (2017) evaluaron las comunidades microbianas de los gránulos anaerobios de un reactor EGSB inoculado con un fango granular procedente de una industria cervecera, el cual se utilizó para el tratamiento de un agua residual industrial con una composición similar a la del agua residual sintética evaluada en este estudio. Aplicando la técnica de DGGE, estos autores encontraron que los microorganismos predominantes en el reactor tras 484 días de operación fueron *Methanosaeta*, *Methanospirillum* y *Methanobacterium*, los cuales también se observaron en el inóculo. En el presente estudio se observó, tanto por la técnica de DGGE como por secuenciación de alto rendimiento, la predominancia de *Methanosaeta*, *Methanobacterium* y de *Methanocorpusculum*. La abundancia de este último microorganismo, que estuvo presente en el fango en suspensión empleado como inóculo, aumentó notablemente y fue superior a la de otros metanógenos. Estos resultados indican que el origen del inóculo pudo haber influido de manera significativa en la estructura de las comunidades. Adicionalmente, las condiciones ambientales y operacionales de los sistemas evaluados, respecto a las del estudio de Bravo et al. (2017), también podrían haber ejercido un efecto sobre la estructura microbiana. La elevada abundancia de metanógenos hidrogenotróficos en el fango formado en los tres reactores indica que la degradación del agua residual hasta metano en los tres sistemas estudiados se produjo a partir de asociaciones sintróficas, con la metanogénesis hidrogenotrófica como una ruta importante para la formación de metano.

5.3 CONCLUSIONES

El trabajo experimental presentado en este capítulo corresponde al estudio de la formación de biomasa granular en tres reactores UASB a escala de laboratorio alimentados de manera continua con un agua residual sintética contaminada con los disolventes etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, principales constituyentes de las emisiones de una industria flexográfica. El estudio se centra en la evaluación del efecto de la adición del polímero natural quitosano en la disminución del tiempo requerido para la formación de biomasa granular y la puesta en marcha de los reactores anaerobios. Las conclusiones que se pueden extraer de la discusión de los resultados obtenidos se enuncian a continuación.

Se ha demostrado que es posible desarrollar un fango granular anaerobio con buenas características fisicoquímicas a partir de un fango en suspensión en reactores UASB alimentados de forma continua con un agua residual sintética que contiene los disolventes etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol como fuente principal de sustrato orgánico.

La adición de dos dosis únicas de quitosano durante la etapa inicial de la puesta en marcha de los reactores R2 y R3 disminuyó el tiempo requerido para la adaptación de un fango en suspensión a un agua residual contaminada con los disolventes orgánicos. La caracterización del inóculo mostró una baja actividad metabólica para degradar la mezcla de disolventes a una temperatura mesofílica subóptima de 25 °C. Por ello, durante las primeras fases de operación se aplicaron cargas orgánicas bajas. No obstante, los reactores con quitosano alcanzaron eficacias de eliminación de la materia orgánica superiores al 92 % en tan sólo 11 días y con una mayor estabilidad, dada la baja concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente. La adición del polímero, además, permitió la aplicación de cargas orgánicas volumétricas mayores en los reactores R2 y R3 respecto al reactor de control, lo cual manifiesta su beneficio en la reducción del tiempo de puesta en marcha de reactores de alta carga alimentados con disolvente orgánicos en condiciones de temperatura ambiente mesofílicas subóptimas.

Los tres sistemas evaluados presentaron un rendimiento satisfactorio operando a una carga orgánica volumétrica máxima de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹,

alcanzando eficacias de eliminación superiores al 90 % y rendimientos de metano cercanos al valor teórico de $0.35 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$. No obstante, el rendimiento de metano del reactor de control fue inferior al de los reactores con quitosano, con un valor de $0.292 \pm 0.008 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ frente a valores de 0.323 ± 0.004 y $0.335 \pm 0.005 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en los reactores R2 y R3, respectivamente. Así pues, la adición de dosis únicas de quitosano resultó en la formación de biomasa granular con una producción específica de metano entre un 10 y un 12 % superior a la del reactor al que no se añadió el polímero.

El efluente de los sistemas estuvo caracterizado por la presencia de 1-etoxi-2-propanol como único disolvente residual. La adición de quitosano permitió la disminución del tiempo requerido para alcanzar eficacias de eliminación de este disolvente orgánico superiores al 70 %. Los reactores con quitosano alcanzaron eficacias de eliminación del 79 % en los primeros 14 días de operación, mientras que en el reactor de control fueron necesarios 40 días para alcanzar una eficacia de eliminación del 70 %. La máxima carga orgánica de 1-etoxi-2-propanol alimentada a los sistemas fue de $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, con eficacias de eliminación del 62 ± 8 , 70 ± 3 y $71 \pm 2 \%$ para el reactor de control y los reactores con quitosano, respectivamente. Se detectaron también posibles compuestos intermediarios de la degradación anaerobia del 1-etoxi-2-propanol (acetona e isopropanol) en concentraciones inferiores a 10 mg L^{-1} . Ambos resultados experimentales indicaron que la hidrólisis o escisión del enlace éter de glicol sería la etapa limitante para la degradación de este compuesto orgánico. La concentración de etanol y de acetato de etilo en el efluente de los reactores se mantuvo por debajo de 10 mg L^{-1} , demostrando una degradación casi completa de ambos disolventes orgánicos. Los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento de los reactores evidenciaron que la adición de quitosano mejoró la adaptación del fango en suspensión para la degradación de los disolventes orgánicos, incluido el 1-etoxi-2-propanol, un disolvente menos biodegradable en condiciones anaerobias en comparación con el etanol y el acetato de etilo

La formación de gránulos se llevó a cabo en un menor tiempo en los reactores UASB suplementados con quitosano, presentando características fisicoquímicas de fangos granulares de buena calidad. El porcentaje de gránulos aumentó a valores superiores del 20 % tras 54 y 112 días en los reactores con quitosano y 169 días en el reactor de control. Los gránulos de los reactores asistidos con quitosano presentaron un tamaño medio de partícula mayor con valores de 540 y 613 μm , contrastando con el valor de 300 μm que se obtuvo en el reactor de control. Estos

gránulos presentaron, además, velocidades de sedimentación 1.4 y 1.8 veces superiores a la de los gránulos del reactor de control. Las mayores actividades metanogénicas que presentaron los gránulos obtenidos con la adición de quitosano para todos los sustratos evaluados explican su mejor rendimiento. El fango anaerobio de los reactores con quitosano presentó una mayor producción de proteínas extracelulares durante el transcurso del experimento coincidente con un mayor tamaño de los gránulos.

La presión selectiva inducida por el aumento en la carga orgánica volumétrica favoreció la formación de gránulos. La carga hidráulica —ligada a la disminución del tiempo de retención hidráulico— y el aumento en la producción de biogás conforme se produjo el aumento de la carga orgánica, propiciaron la formación de biomasa granular en los tres sistemas evaluados. No obstante, la adición de quitosano favoreció la formación de agregados en un menor tiempo, disminuyendo así el periodo requerido por los reactores para tratar las cargas orgánicas impuestas con resultados superiores en cuanto a rendimiento.

La estructura microbiana de los tres sistemas fue muy similar y presentó un cambio sustancial respecto a la del inóculo. Del análisis de las comunidades microbianas destaca la predominancia de bacterias capaces de realizar un metabolismo sintrófico, como *Geobacter*, *Pelobacter*, *Smithella*, *Syntrophus* y *Desulfovibrio*. En la primera etapa de operación, la población de arqueas se vio afectada por el cambio en las condiciones ambientales y la exposición del fango en suspensión a los disolventes orgánicos. El reactor de control fue el que presentó mayores cambios; en particular, la presencia de especies del género *Methanosaeta*, importantes en la formación y mantenimiento del fango granular anaerobio, disminuyó en mayor medida que en los reactores con quitosano. Las dos técnicas de biología molecular aplicadas para el análisis de las poblaciones microbianas permitieron determinar que los microorganismos predominantes en el fango granular de los tres reactores UASB pertenecen a los géneros *Geobacter* y *Methanocorpusculum*, este último con una abundancia relativa entre el 25 y el 30 % en los tres sistemas. La presencia de este último microorganismo en tan alta abundancia relativa se asoció con la temperatura mesofílica subóptima del experimento. Además, la alta abundancia de este microorganismo hidrogenotrófico durante las distintas fases de operación, aun cuando el metanógeno acetoclástico *Methanosaeta* se observó en todos los reactores y la concentración de ácidos grasos volátiles se mantuvo en valores bajos en condiciones de operación estable, puso de

manifiesto su participación en la formación de gránulos en reactores anaerobios de alta carga operados a bajas temperaturas.

La ausencia de especies de metanógenos capaces de utilizar el etanol y el predominio de metanógenos hidrogenotróficos en los tres reactores indicó que la degradación del agua residual hasta metano se produjo a partir de asociaciones sintróficas entre bacterias y microorganismos metanogénicos, con la metanogénesis hidrogenotrófica como una ruta importante para la producción de metano.

**6 TRATAMIENTO ANAEROBIO DE UN AGUA
RESIDUAL SINTÉTICA CONTAMINADA CON
DISOLVENTES ORGÁNICOS EN CONDICIONES
DE ALIMENTACIÓN INTERMITENTE**

Los reactores anaerobios de lecho granular han demostrado ser una tecnología eficaz para el tratamiento de aguas residuales de origen industrial (Lim y Kim, 2014), incluyendo efluentes contaminados con disolventes orgánicos del sector flexográfico (Bravo et al., 2017). No obstante, aún persisten inconvenientes en cuanto a su aplicación a escala industrial, principalmente, debido a la sensibilidad del proceso de degradación anaerobia a perturbaciones en las condiciones operacionales y ambientales (Ketheesan y Stuckey, 2015).

En la práctica, los sistemas de tratamiento están sujetos a perturbaciones operacionales tales como la variación del caudal, la composición y la concentración del agua residual del afluente, que a su vez, dependen de la dinámica de los procesos productivos de la industria emisora, y que pueden afectar a la estabilidad del reactor, a la dinámica de las poblaciones microbianas y a la eficacia del tratamiento (Kundu et al., 2013; Leitão et al., 2006b). En particular, en el tratamiento anaerobio de efluentes líquidos contaminados con disolventes orgánicos se ha observado la desintegración total o parcial del fango granular debido a variaciones en las condiciones de operación, tales como cambios en la composición y en la concentración de los disolventes en el agua residual (Henry et al., 1996; Vermorel et al., 2017), la aplicación de altas cargas orgánicas (Enright et al., 2005; Lafita et al., 2015; Lu et al., 2015a), las fluctuaciones en la carga orgánica y en la carga hidráulica aplicada (Lafita et al., 2015), o la exposición del fango a disolventes específicos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos anaerobios (Costa et al., 2009). La desintegración o pérdida de la integridad estructural de los gránulos puede causar el lavado de la biomasa, la disminución de la eficacia de eliminación de la materia orgánica, la acumulación de ácidos grasos volátiles, la disminución de la producción de biogás y del contenido de metano del mismo y, en definitiva, la disminución de la capacidad del tratamiento. Así pues, para la aplicación efectiva de los reactores de lecho granular en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos, además de la formación inicial de gránulos, es importante mantener la estructura granular durante la operación dinámica del sistema, de manera que se asegure la calidad del efluente y la eficacia del tratamiento.

En este capítulo se evalúa el efecto de la alimentación intermitente en el rendimiento de reactores UASB aplicados al tratamiento de un agua residual sintética contaminada con los disolventes orgánicos etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol en una proporción másica 7:2:1, respectivamente, y el efecto de dicha

alimentación intermitente sobre las características fisicoquímicas del fango granular anaerobio. Además, se evalúa la dinámica de las poblaciones microbianas al someterlas a interrupciones en la alimentación de sustrato orgánico.

El estudio se realizó en tres reactores UASB operados a temperatura ambiente y en condiciones de alimentación intermitente del agua residual sintética. A fin de simular condiciones de operación típicas de las instalaciones industriales (Bravo, 2017), se realizaron interrupciones del suministro del agua residual durante las noches y durante los fines de semana. Los reactores —R1, R2 y R3— se inocularon con el fango granular obtenido en el estudio de granulación presentado en el Capítulo 5 en condiciones de alimentación continua de agua residual. El estudio se llevó a cabo en 4 fases, correspondiendo cada fase a la aplicación de una carga orgánica diferente. La operación con alimentación intermitente se inició aplicando una carga orgánica volumétrica de $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Fase I, días 0-48) con un patrón de alimentación de 16 horas al día durante 5 días a la semana. Dicho patrón se mantuvo durante los 147 días del estudio. En las fases posteriores (Fases II, III y IV), la carga orgánica volumétrica se aumentó desde un valor de $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ hasta $50 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el reactor R1, y hasta $75 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en los reactores R2 y R3. Como estrategia para prevenir la desintegración de la biomasa granular, en el reactor R2 se realizaron adiciones periódicas de quitosano.

A lo largo del estudio se realizó el seguimiento de la operación de los reactores y de su respuesta transitoria a la reanudación del suministro de sustrato orgánico, se evaluaron las características fisicoquímicas del fango granular y se realizó el análisis de la variación temporal de las poblaciones microbianas. En el capítulo 4, correspondiente a Materiales y Métodos, se describe el montaje experimental empleado para llevar a cabo los ensayos que se presentan en este estudio, la composición del agua residual sintética y las técnicas analíticas utilizadas.

6.1 PLAN DE TRABAJO

A continuación, se describe el plan de trabajo que se siguió para la realización de los experimentos correspondientes al estudio en condiciones de alimentación intermitente de agua residual sintética.

6.1.1 Puesta en marcha y operación de los reactores UASB

El estudio se llevó a cabo en tres reactores UASB, referenciados como R1, R2 y R3, todos ellos con la configuración de 7.8 L de volumen efectivo que se ilustra en la Figura 4.1 del Capítulo 4. Cada reactor se inoculó con 2.5 L del fango granular desarrollado en el estudio presentado en el Capítulo 5. El reactor R1 se inoculó con el fango granular obtenido sin la adición de quitosano, mientras que los reactores R2 y R3 se inocularon con el fango granular obtenido con la adición del polímero. Los reactores de los cuales se obtuvo cada inóculo se encontraban operando a una carga orgánica de 20 kg de DQO m⁻³ d⁻¹. Para la puesta en marcha de los reactores, cada fango granular se tamizó utilizando un tamiz de paso de luz de 50 µm a fin de eliminar las partículas finas y uniformizar el tamaño de partícula en los tres sistemas. Así, el porcentaje inicial de gránulos fue del 73.2 % en el fango del reactor R1, del 76.0 % en el reactor R2 y del 74.7 % en el reactor R3, siendo el tamaño medio de partícula de 500, 570 y 625 µm, respectivamente. En la Tabla 6.1 se presentan las características del inóculo de cada reactor.

Tabla 6.1. Características del fango inóculo de cada reactor UASB.

Parámetro	R1	R2	R3
SST (g L ⁻¹)	42.3	43.6	61.4
SSV (g L ⁻¹)	38.2	37.6	50.5
AME (NmL CH ₄ g SSV ⁻¹ d ⁻¹)*	245 ± 3	391 ± 5	440 ± 2
Tamaño medio de partícula (µm)	500	570	625

*Actividad metanogénica específica (AME) para la mezcla de disolventes: etanol, acetato de etilo y E2P en relación másica 7:2:1.

Las características del inóculo del reactor R1 fueron similares a las del reactor R2 tras el tamizado, excepto por una menor actividad metanogénica específica. Las características del inóculo del reactor R3 presentaron valores mayores en comparación con las de los otros dos reactores debido al proceso de granulación más eficiente observado en este reactor, tal como se discutió en el Capítulo 5.

El estudio se llevó a cabo a temperatura ambiente (26.1 ± 1.1 °C) y se dividió en cuatro fases operacionales diferenciadas por el aumento de la carga orgánica volumétrica. En la Tabla 6.2 se muestran las condiciones de operación que se establecieron durante cada fase de operación. El agua residual sintética se alimentó a los reactores en un patrón intermitente de 16 h al día durante 5 días a la semana.

La alimentación del agua residual se interrumpió durante las noches (interrupción de 8 horas) y durante los fines de semana (interrupción de 56 horas) a fin de asemejar la operación a escala de laboratorio con la operación típica de las instalaciones industriales, relacionada con la operación por turnos en los procesos productivos.

Tabla 6.2. Condiciones de operación durante la puesta en marcha y la operación de los reactores UASB.

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	
Tiempo (días)	(0–48)	(49–90)	(91–108)	(109–147)	
Reactor	R1-R2-R3	R1-R2-R3	R1-R2-R3	R1	R2-R3
CO _{16-horas} ¹	20	25	35	35-50	50 - 75
CO _{24-horas} ²	13.3	16.7	23.3	23.3-31.3	31.3-46.9
C _e (g DQO L ⁻¹)	8.3	10.4	14.6	14.6-20.8	20.8-31.3
TRH (d)	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
V _a (m h ⁻¹)	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0
Temperatura (°C)	26.6 ± 0.8	26.2 ± 0.8	26.6 ± 0.3	25.5 ± 1.4	

¹CO_{16-horas} (kg DQO m⁻³ d⁻¹): carga orgánica aplicada durante la operación intermitente de 16 horas al día con alimentación de agua residual.

²CO_{24-horas} (kg DQO m⁻³ d⁻¹): carga orgánica aplicada calculada a 24 horas: 16 horas con alimentación y 8 horas sin alimentación de agua residual.

En la Fase I (días 0-48) los tres sistemas se pusieron en marcha y se operaron con una carga orgánica volumétrica de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹ aplicada de manera intermitente. La carga orgánica en un ciclo de operación de 24 horas, es decir, 16 horas de alimentación y 8 horas sin alimentación, corresponde a un valor de 13.3 kg DQO m⁻³ d⁻¹ para la Fase I. En las siguientes fases de operación, Fase II (días 49-90) y Fase III (días 91-108), se aplicaron cargas orgánicas intermitentes de 25 kg DQO m⁻³ d⁻¹ y de 35 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente. De acuerdo con la capacidad de tratamiento de cada sistema, en la última fase de operación, Fase IV (días 109-147), la carga se incrementó hasta un valor de 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en el reactor R1, y de hasta 75 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en los reactores R2 y R3. El tiempo de retención hidráulico de cada reactor se fijó en 10 horas, de modo que el incremento de la carga orgánica en cada fase se realizó mediante el aumento del caudal de inyección de los disolventes orgánicos para aumentar así la concentración de sustrato orgánico en la corriente de entrada de los reactores. Durante la realización de los experimentos se aplicaron concentraciones de materia orgánica en la corriente de entrada de los reactores en el intervalo comprendido entre 8.3 y 31.3

g DQO L⁻¹. El incremento de la carga orgánica se efectuó una vez alcanzadas condiciones de estado pseudo-estacionario definidas como variaciones de menos del 5 % en la eficacia de eliminación y en la producción de metano durante al menos tres mediciones consecutivas.

Durante la Fase I se aplicó una corriente de recirculación de 0.88 L h⁻¹ para fijar la velocidad ascensional del líquido en 0.5 m h⁻¹. Al iniciar la Fase II y hasta finalizar el estudio, se aplicó un caudal de recirculación de 2.5 L h⁻¹ a fin de mantener la velocidad ascensional del líquido en un valor de 1.0 m h⁻¹. En todas las fases de operación el caudal de recirculación se mantuvo durante los periodos sin suministro de agua residual para promover la desgasificación del lecho. Además, con el fin de estudiar la adición de quitosano como estrategia para prevenir la pérdida de la integridad estructural de los gránulos y favorecer la retención de la biomasa bajo condiciones de operación intermitente, en el reactor R2 se añadió una dosis de quitosano de 2.4 mg g SSV⁻¹ cada tres semanas.

El control de la operación de los sistemas y la evaluación de su rendimiento durante el transcurso del estudio se llevaron a cabo mediante la determinación de los parámetros mostrados en la Tabla 6.3, junto con la frecuencia de su determinación. El rendimiento de los reactores se evaluó de acuerdo con la eficacia de eliminación de la materia orgánica, la producción de metano y la eficacia de degradación de los disolventes orgánicos. A fin de evaluar la respuesta dinámica de los reactores tras la reanudación del suministro de agua residual, los parámetros anteriormente mencionados, al igual que los parámetros de control y seguimiento: pH, alcalinidad, concentración de ácidos grasos volátiles, conductividad y temperatura, se determinaron cada 2 horas a partir de la reanudación de la alimentación durante un periodo de 8 horas. La respuesta dinámica se evaluó dos veces por semana: los lunes, después de un periodo de 56 horas sin alimentación de agua residual, y los jueves, tras un periodo sin alimentación de 8 horas.

Tabla 6.3. Parámetros evaluados durante la operación de los reactores y frecuencia de determinación.

Parámetro	Frecuencia de determinación
Caracterización del efluente	
pH	*Dos veces por semana
Temperatura	*Dos veces por semana
Conductividad	*Dos veces por semana
Alcalinidad	*Dos veces por semana
AGV	*Dos veces por semana
DQO	*Dos veces por semana
Concentración de disolventes	*Dos veces por semana
Contenido de sólidos	Dos veces por semana
Composición de cationes y aniones	Una vez por semana
Producción de biogás	
Caudal de biogás	Medición en continuo dos veces por semana
Composición de biogás	*Dos veces por semana

*Mediciones realizadas cada dos horas durante un periodo de 8 horas dos veces por semana: tras la reanudación de la alimentación después de los periodos de 56 h sin suministro (lunes), y después de un periodo de 8 horas sin suministro (jueves).

6.1.2 Evaluación de las características del fango granular anaerobio

El efecto del suministro intermitente de agua residual sobre las características fisicoquímicas del fango granular de cada reactor se evaluó a partir de la determinación de la distribución de tamaño de partícula y de la producción de polímeros extracelulares (EPS) para las diferentes muestras que se tomaron durante el estudio. La distribución de tamaño de partícula se determinó para las muestras tomadas de los reactores en los días 15, 29, 43, 58, 79, 100, 126 y 147. La producción de EPS se evaluó en las muestras tomadas en los días 29, 58, 100, 126 y 147. En varios estudios se ha observado que la desintegración del fango granular en reactores anaerobios que operan bajo condiciones de estrés hidráulico u orgánico está relacionada con la variación de las fracciones de las EPS que excretan los microorganismos (Ding et al., 2015; Lu et al., 2015b). En el presente estudio se evaluaron dos fracciones de las EPS: las EPS en el licor mezcla del reactor o EPS solubles (EPS-S), y las EPS fuertemente unidas al fango (EPS-F).

6.1.3 Análisis de las comunidades microbianas

El análisis de las comunidades microbianas y su variación durante el estudio se realizó para las muestras correspondientes al inóculo de cada reactor y a las muestras de fango tomadas los días 58, 100, 126 y 147. Este análisis se llevó a cabo mediante DGGE. Adicionalmente, las muestras de fango del inóculo de cada reactor y las tomadas al finalizar el experimento (día 147) se analizaron mediante secuenciación de alto rendimiento.

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1 Operación de los reactores

En este apartado se exponen y se analizan los resultados obtenidos en relación con la estabilidad y el rendimiento de los reactores UASB durante las diferentes fases de operación. La estabilidad de los sistemas se evaluó de acuerdo con los parámetros de control del efluente: el pH, la alcalinidad, la conductividad, la concentración de ácidos grasos volátiles y la pérdida de sólidos. El rendimiento se determinó mediante la evaluación de la eficacia de degradación de la materia orgánica, la producción de metano y la eficacia de degradación de cada disolvente. En la Tabla 6.4 se presentan los resultados obtenidos en cada fase de operación. Los resultados que se recogen en dicha tabla corresponden al promedio, junto con su desviación estándar, de las mediciones realizadas tras 8 horas de la reanudación del suministro de sustrato orgánico. En los tres reactores destaca la estabilidad de los parámetros evaluados durante las Fases I, II y III en las que se aplicaron cargas orgánicas intermitentes de 20, 25 y 35 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente, demostrando la obtención de condiciones pseudo-estacionarias a pesar de la alimentación intermitente del agua residual sintética. En estas fases se obtuvieron altas eficacias de eliminación de la materia orgánica, superiores al 95 %. Para los disolventes orgánicos etanol y acetato de etilo se obtuvieron eficacias de eliminación superiores al 99 % durante la mayor parte del estudio. Para el 1-etoxi-2-propanol las eficacias de eliminación obtenidas fueron inferiores, con valores en el intervalo comprendido

Tabla 6.4. Resultados de los parámetros de control y de rendimiento obtenidos para cada reactor en cada fase de operación.

Tiempo (días)	Fase I (0 - 48)			Fase II (49 - 90)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Reactor						
CO ⁻¹ (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)		20			25	
CO _{E2P2} (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)		2.1			2.6	
EE (%)	96 ± 3	96 ± 1	97 ± 2	97 ± 1	97 ± 1	97 ± 1
EE _{E2P} (%)	77 ± 4	75 ± 8	83 ± 4	80 ± 4	82 ± 4	83 ± 4
Q CH ₄ (L CH ₄ d ⁻¹)	39.9 ± 3.7	45.1 ± 5.2	44.4 ± 5.1	53.8 ± 4.4	54.9 ± 5.4	51.3 ± 4.6
Y CH ₄ (Nm ³ CH ₄ kg DQO ⁻¹ -degradada)	0.267 ± 0.026	0.300 ± 0.036	0.294 ± 0.037	0.288 ± 0.024	0.289 ± 0.030	0.273 ± 0.027
pH	7.5 ± 0.2	7.5 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.4 ± 0.1	7.4 ± 0.1	7.4 ± 0.2
Conductividad (mS cm ⁻¹)	6.1 ± 0.5	6.0 ± 0.4	6.1 ± 0.3	5.4 ± 0.6	5.4 ± 0.5	5.4 ± 0.6
Alcalinidad (g CaCO ₃ L ⁻¹)	2.9 ± 0.5	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.4

Tabla 6.4. (Continuación). Resultados de los parámetros de control y de rendimiento obtenidos para cada reactor en cada fase de operación.

Tiempo (días)	Fase III (91 - 108)			Fase IV (109 - 147)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Reactor						
CO ¹ (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)		35		35-50		50-75
CO _{EZP} ² (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)		3.7		3.7-5-3		5.3-7.9
EE (%)	97 ± 1	97 ± 1	97 ± 3	93 ± 8	93 ± 12	92 ± 18
EE _{EZP} (%)	84 ± 3	82 ± 4	85 ± 3	74 ± 9	82 ± 6	83 ± 7
Q CH ₄ (L CH ₄ d ⁻¹)	66.9 ± 5.4	71.6 ± 4.0	68.9 ± 5.1	58.8 ± 18.0	97.7 ± 16.0	91.8 ± 18.0
Y CH ₄ (Nm ³ CH ₄ kg DQO ⁻¹ -degradada)	0.254 ± 0.021	0.272 ± 0.020	0.259 ± 0.020	0.215 ± 0.073	0.256 ± 0.016	0.242 ± 0.020
pH	7.4 ± 0.2	7.3 ± 0.2	7.2 ± 0.1	7.3 ± 0.8	7.2 ± 0.7	7.2 ± 0.7
Conductividad (mS cm ⁻¹)	5.4 ± 0.3	5.3 ± 0.3	5.4 ± 0.3	6.0 ± 0.5	6.0 ± 0.6	5.9 ± 0.6
Alcalinidad (g CaCO ₃ L ⁻¹)	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.7	2.3 ± 0.6

¹Carga orgánica global aplicada durante 16 horas al día.²Carga orgánica de 1-etoxi-2-propanol aplicada durante 16 horas al día

entre el 70 y el 85 %. En la Fase IV, la respuesta de los reactores a los incrementos de la carga orgánica (hasta 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en el reactor R1 y hasta 75 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en los reactores R2 y R3) fue más inestable, tal como lo refleja la desviación estándar de los parámetros evaluados. Pese a ello, se obtuvieron eficacias de eliminación de la materia orgánica superiores al 90 %, evidenciando así la capacidad de los sistemas para el tratamiento del agua residual contaminada con los disolventes estudiados aplicando altas cargas orgánicas con un patrón intermitente. El pH de los reactores R2 y R3 presentó valores ligeramente más bajos en la Fase IV como resultado del aumento de la carga orgánica, tal como se describirá en la siguiente sección. Además, destacan los rendimientos de metano relativamente bajos obtenidos en los tres reactores en comparación con aquéllos obtenidos en la última fase del estudio con alimentación continua de agua residual (Tabla 5.4, Capítulo 5), indicado que la operación con suministro intermitente de agua residual afectó a la producción de metano por unidad de materia orgánica degradada. En los siguientes apartados se detallan los resultados del rendimiento y la operación de los reactores en cada fase de operación.

Eficacia de eliminación de la materia orgánica, estabilidad y producción de metano

En la Figura 6.1 se presenta la carga orgánica volumétrica aplicada a los reactores durante los periodos con alimentación del agua residual sintética y los resultados correspondientes a la eficacia de eliminación de la materia orgánica (Figura 6.1a), la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente (Figura 6.1b) y la producción de metano (Figura 6.1c). Debido a la adaptación previa del inóculo de cada reactor a la degradación del agua residual de interés, se obtuvieron eficacias de eliminación de la materia orgánica superiores al 94 % desde el comienzo del estudio. Estas eficacias de eliminación se mantuvieron durante las Fases I, II y III operando con cargas orgánicas de 20, 25 y 35 kg DQO m⁻³ d⁻¹, evidenciando así la degradación casi completa del sustrato orgánico alimentado, con ligeras disminuciones asociadas al incremento de la carga orgánica en cada fase. Las concentraciones de ácidos grasos volátiles en el efluente fueron bajas, mostrando incrementos puntuales en respuesta al incremento de la carga orgánica. Así, en las Fases I y II la concentración de ácidos grasos volátiles aumentó hasta valores cercanos a 200 mg L⁻¹ para luego disminuir de manera progresiva hasta alcanzar valores inferiores a 10 mg L⁻¹ en los reactores R1 y R2, y entre 30 y 80 mg L⁻¹ en el reactor R3. En la Fase III los reactores R1 y R2 presentaron un comportamiento semejante, alcanzando concentraciones de ácidos grasos volátiles inferiores a 20 mg L⁻¹.

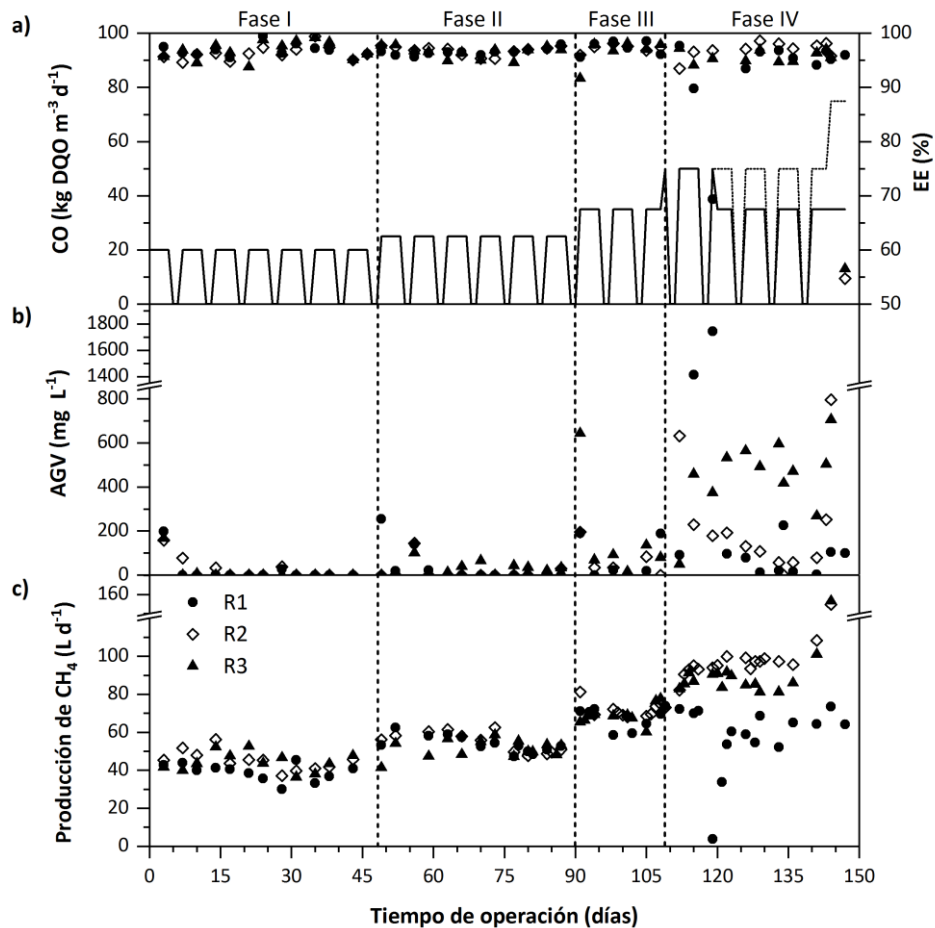


Figura 6.1. Variación temporal de: a) la carga orgánica volumétrica aplicada a cada reactor en un patrón intermitente de 16 horas al día durante 5 días a la semana (—) y de la eficacia de degradación de la materia orgánica (R1●; R2◇; R3▲), b) concentración de ácidos grasos en el efluente y c) producción de metano.

Por su parte, en el reactor R3 el incremento de la carga orgánica a $35 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ produjo una acumulación inicial de ácidos grasos volátiles de hasta 650 mg L^{-1} , disminuyendo posteriormente hasta alcanzar un valor de 80 mg L^{-1} . Lafita et al. (2015) obtuvieron resultados similares durante el tratamiento intermitente de una mezcla de metanol y 1-etoxi-2-propanol en una relación másica 4:1, alcanzando

eficacias de eliminación superiores al 90 % al aplicar una carga orgánica de 35 kg DQO m⁻³lecho d⁻¹ en patrones de 16 horas al día durante 5 y 7 días a la semana.

Al iniciarse la Fase IV en el día 109, la carga orgánica se incrementó hasta un valor de 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹. El incremento de la carga produjo la acumulación de ácidos grasos volátiles en el efluente del reactor R1 hasta un valor de 1750 mg L⁻¹, con el descenso concomitante de la eficacia de eliminación hasta un valor del 70 % y del pH hasta 5.0, mostrando la incapacidad de los microorganismos para efectuar el tratamiento de la carga orgánica aplicada. Dada la sensibilidad de los metanógenos a las variaciones del pH, con el fin de evitar la inhibición de la metanogénesis, en el día 120 la carga orgánica se disminuyó hasta el valor de la fase previa, 35 kg DQO m⁻³ d⁻¹, obteniéndose así eficacias de degradación superiores al 90 % y concentraciones de ácidos grasos volátiles comprendidas entre 10 y 230 mg L⁻¹. Los reactores R2 y R3 mostraron un rendimiento estable operando a una carga de 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹, con eficacias de eliminación la materia orgánica superiores al 90 %, aunque las concentraciones de ácidos grasos volátiles detectadas en el efluente fueron superiores a las de las fases previas. En el efluente de reactor R2 la concentración de ácidos grasos volátiles descendió desde un valor de 630 mg L⁻¹ detectado en el día 112, hasta un valor de 60 mg L⁻¹, previo al siguiente incremento de la orgánica. Por otra parte, la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente del reactor R3 osciló en el intervalo comprendido entre 270 y 500 mg L⁻¹. El comportamiento más estable del reactor R2 puede atribuirse a la adición periódica de quitosano, contribuyendo a una mayor retención de biomasa, tal como se muestra posteriormente y, por tanto, a una mayor actividad metabólica. Al término de la Fase IV, en el día 144, la carga orgánica se incrementó hasta un valor de 75 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en los reactores R2 y R3. La aplicación de esta elevada carga orgánica excedió la capacidad de los microorganismos en el interior de los reactores, conllevando la acumulación de ácidos grasos volátiles y la acidificación de los sistemas. En estas condiciones, los ácidos grasos volátiles alcanzaron, tras dos ciclos de operación, valores de 6600 y 6200 mg L⁻¹ en los reactores R2 y R3, respectivamente, con el descenso del pH hasta un valor de 5.0 y de la eficacia de degradación de la materia orgánica hasta el 55 % (Figura 6.1a). De acuerdo con los resultados relativos a la eficacia del tratamiento y a la estabilidad de los sistemas, se puede concluir que el UASB es una configuración de reactor robusta para el tratamiento intermitente de un agua residual sintética contaminada con los disolventes orgánicos de interés industrial alimentados, aplicando cargas orgánicas de hasta 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Respecto a la producción de metano, ésta aumentó de acuerdo con el incremento en la carga orgánica aplicada, alcanzando valores relativamente estables al finalizar cada fase de operación (Tabla 6.4). Durante la Fase I, la producción de metano de los sistemas cuyo inóculo procedió de los reactores suplementados con quitosano (Capítulo 5), R2 ($45.1 \pm 5.2 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1}$) y R3 ($44.4 \pm 5.1 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1}$), fue superior a la producción del reactor R1 ($39.9 \pm 3.7 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1}$). En la Fase II, los tres reactores presentaron una producción en el intervalo de 50 a 55 L d^{-1} . En las fases subsiguientes, el reactor R2, al cual se adicionó quitosano de manera periódica cada 3 semanas, presentó una producción de metano superior a la de los reactores R1 y R3 con diferencias entre el 4 y el 7 %, sin considerar los resultados del reactor R1 en la Fase IV, cuya desestabilización condujo a una producción de metano muy inferior. Los resultados obtenidos en cuanto a la producción de metano sugieren que la actividad metanogénica de un reactor UASB operado a altas cargas orgánicas puede mejorarse mediante la adición del polímero. Estos resultados son consistentes con la actividad metanogénica específica del fango de los tres sistemas, la cual se evaluó en el día 126. También en este caso se obtuvo en el reactor R2 una actividad metanogénica específica superior, de $530 \text{ NmL CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, frente a valores de 465 y 450 $\text{NmL CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en los reactores R1 y R3 respectivamente, representando así una mejora entre el 12 y el 15 %. En la línea de los resultados obtenidos, Lafita et al. (2016) observaron una mejora del 6 % para la actividad metanogénica específica de un fango suplementado con una dosis única de quitosano en el tratamiento continuo de un agua residual sintética contaminada con etanol y 1-metoxi-2-propanol.

El rendimiento promedio de metano obtenido a lo largo del experimento para cada reactor fue de $0.256 \pm 0.051 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1} \text{ degradada}$ para el R1, $0.282 \pm 0.032 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1} \text{ degradada}$ para el R2 y $0.268 \pm 0.035 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1} \text{ degradada}$ para el R3. En los tres reactores se observó una disminución del rendimiento de metano al aumentar la carga orgánica aplicada. En todos los casos, durante la operación intermitente los valores obtenidos fueron inferiores a los alcanzados durante el tratamiento en continuo —ceranos en aquel caso al valor estequiométrico de $0.350 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1} \text{ degradada}$ —, indicando que no todo el sustrato degradado fue convertido a metano y, evidenciando un cambio de la respuesta de la biomasa bajo condiciones de alimentación intermitente. En otros estudios en los que se ha evaluado el rendimiento de reactores de lecho granular operando en condiciones de carga hidráulica o de carga orgánica variables, también se han reportado

rendimientos de metano inferiores al valor estequiométrico. A modo de ejemplo, Kundu et al. (2013) obtuvieron rendimientos de metano en el intervalo de 0.10 a 0.29 m³ CH₄ kg DQO⁻¹_{degradada} en un reactor híbrido alimentado con glucosa aplicando cargas orgánicas crecientes de 2.2 a 10.0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Por su parte, Lafita (2016) obtuvo un rendimiento promedio de metano de 0.173 ± 0.063 Nm³CH₄ kg DQO⁻¹_{degradada} en un reactor EGSB empleado para la depuración intermitente de un agua residual sintética contaminada con etanol y 1-metoxi-2-propanol.

El contenido de metano en el biogás fue muy uniforme en los tres reactores, con valores del 71.1 ± 1.5, 71.2 ± 1.6 y 71.0 ± 2.9 % en el reactor R1, el R2 y el R3, respectivamente.

Eficacia de degradación de los disolventes orgánicos

El efluente de los tres reactores se caracterizó por la presencia del éter de glicol 1-etoxi-2-propanol a lo largo del experimento debido a su menor biodegradabilidad, tal como se ha mostrado en el Capítulo 5. Los otros componentes de la mezcla ternaria, etanol y acetato de etilo, se degradaron con eficacias superiores al 99 % durante la mayor parte del estudio (excepto durante el episodio de sobrecarga del reactor R1 en el día 119, y de los reactores R2 y R3 en el día 147). En la Figura 6.2 se muestra la variación temporal de la carga orgánica intermitente de 1-etoxi-2-propanol aplicada y su eficacia de eliminación en cada reactor.

En la Fase I, operando con una carga orgánica de 2.1 kg DQO m⁻³ d⁻¹, el reactor R3 exhibió una ligera mayor eficacia de degradación con un valor promedio de 83 ± 4% respecto a los valores del 77 ± 4 y del 80 ± 8 % obtenidos en el reactor R1 y en el reactor R2, respectivamente. En las Fases II y III los tres sistemas alcanzaron eficacias de eliminación similares, comprendidas entre el 80 y el 85 %, operando a una carga orgánica de 3.7 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Estas eficacias se mantuvieron en los reactores R2 y R3 durante la Fase IV operando, en este caso, con una carga orgánica de 5.3 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Ferrero et al. (2018) reportaron resultados análogos para el tratamiento continuo de una mezcla de etanol y 1-etoxi-2-propanol (relación másica 9:1), alcanzando eficacias de eliminación alrededor del 80 % al tratar una carga orgánica de 5.1 kg DQO m⁻³_{lecho} d⁻¹. La sobrecarga del reactor R1 en el día 119 condujo a la disminución de la capacidad de degradación del 1-etoxi-2-propanol. Aunque la carga orgánica se redujo al valor previo a la sobrecarga, la concentración

de 1-etoxi-2-propanol en el efluente fue ligeramente superior a la detectada durante la Fase III, resultando en un valor promedio de la eficacia de eliminación del $70 \pm 8 \%$. El descenso del pH ocasionado por la acumulación de los ácidos grasos volátiles pudo afectar adversamente a las poblaciones de microorganismos capaces de realizar la degradación de este disolvente orgánico.

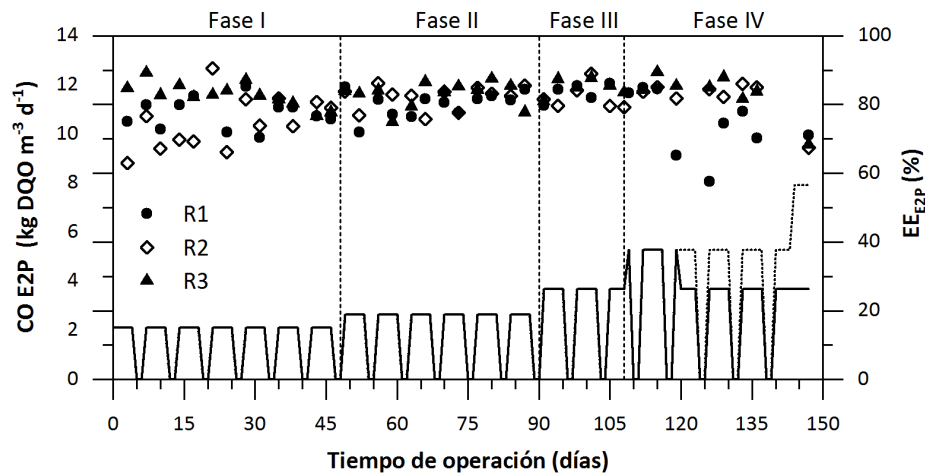


Figura 6.2. Variación temporal de la carga de 1-etoxi-2-propanol (E2P) aplicada y de la eficacia de eliminación de este disolvente orgánico en cada reactor UASB.

Los subproductos acetona e isopropanol se volvieron a detectar en el efluente de los tres reactores, en este caso, en concentraciones inferiores a 30 y a 10 mg L⁻¹, respectivamente, exceptuando los episodios de sobrecarga en los que el isopropanol alcanzó valores de 160, 85 y 80 mg L⁻¹, y la acetona valores de 78, 47 y de 173 mg L⁻¹ en los reactores R1, R2 y R3, respectivamente. Como se indicó en el capítulo anterior, la acetona se ha propuesto como producto intermediario en la degradación de éteres de glicol como el 1-etoxi-2-propanol, y el isopropanol puede producirse mediante la reducción reversible de acetona en presencia de H₂ (Ferrero et al., 2018; Widdel, 1986; Zellner y Winter, 1987). La degradación anaerobia de isopropanol se realiza mediante su deshidrogenación para la formación de acetona. Esta deshidrogenación es llevada a cabo por algunos microorganismos hidrogenotróficos pertenecientes a los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacterales*, que utilizan el H₂ para la reducción de CO₂, excretando como producto final metano (Tonouchi, 2004; Zellner y Winter, 1987). La completa degradación del isopropanol a metano y a dióxido de carbono involucra arqueas

metanogénicas que utilizan isopropanol como sustrato y a bacterias degradadoras de acetona en sintrofia con metanógenos acetoclásticos.

Retención de sólidos

En la Figura 6.3 se muestra la variación de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) en el efluente de los reactores durante el estudio. En los reactores R1 y R3 la concentración promedio de sólidos en el efluente fue del mismo orden, con valores de 353 ± 564 y 323 ± 517 mg SST L⁻¹. La alta desviación de los resultados obtenidos corresponde al aumento del lavado de sólidos en algunos días de operación, que sin estar relacionado con un aumento específico de la carga orgánica o con el deterioro del proceso de tratamiento, puede obedecer a la dinámica del lecho de fagos durante la alimentación intermitente. En el reactor R2, la pérdida de sólidos fue menor, con un valor promedio de 128 ± 100 mg L⁻¹. La menor pérdida de sólidos en el reactor R2 se atribuye a la adición periódica de quitosano, la cual permitió una mayor retención de partículas finas susceptibles a ser lavadas del reactor durante los ciclos de operación.

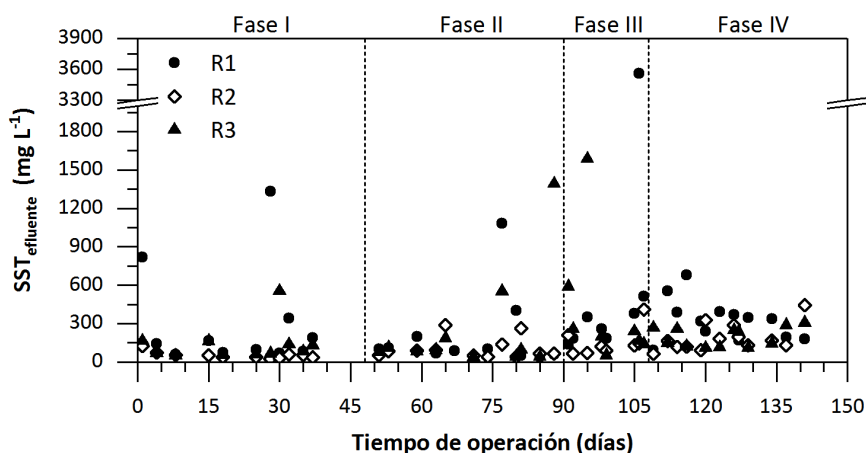


Figura 6.3. Variación temporal de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) en el efluente de cada reactor.

Cabe señalar que las mediciones de SST se realizaron 2 horas después de la reanudación de la alimentación del agua residual sintética. Por lo tanto, los resultados que se muestran corresponden al periodo transitorio en el que el reinicio

de la producción de biogás y el aumento, en su caso, de la velocidad ascensional al reanudarse la alimentación, causaban la expansión del lecho de fangos propiciando el lavado de biomasa. De hecho, una vez establecido el equilibrio entre la velocidad ascensional del líquido, la producción de biogás y la velocidad de sedimentación del fango, y coincidiendo con la estabilización en la producción de biogás, se observó la reducción de la expansión del lecho y una menor pérdida de sólidos en el efluente de cada reactor. Leitão et al. (2006a) observaron este fenómeno en reactores UASB que operaban con perturbaciones en la carga hidráulica y en la carga orgánica; mientras que Garuti et al. (2003) encontraron que, interrupciones superiores a 1 hora del afluente de reactores anaerobios produjeron una pérdida considerable de sólidos al reanudarse el flujo del alimento.

6.2.2 Respuesta dinámica a la reanudación del suministro agua residual

La respuesta dinámica de los reactores a la reanudación del suministro de agua residual se evaluó dos veces por semana en todas las fases experimentales tras los periodos de 8 y 56 horas sin alimentación. La concentración de ácidos grasos volátiles y la concentración de materia orgánica en el efluente de los reactores, al igual que la producción de metano, se determinaron cada dos horas desde el inicio de cada ciclo de operación hasta 8 horas después. La Figura 6.4 muestra la variación temporal de la concentración de ácidos grasos volátiles y del rendimiento de metano de cada reactor tras los periodos de 8 horas (Figura 6.4a) y 56 horas (Figura 6.4b) sin alimentación de agua residual. Con el fin de analizar la respuesta de los sistemas en los periodos transitorios, independientemente de la carga orgánica aplicada, la información experimental se ha agrupado en la Figura 6.4 mostrando, para los ácidos grasos volátiles, los valores promedio obtenidos en las Fases I, III y III. En la Fase IV, como se indicó previamente, la concentración de ácidos grasos volátiles aumentó como resultado de la aplicación de una carga orgánica mayor, detectándose concentraciones superiores a 300 mg L^{-1} en los tres sistemas, por lo que los resultados de la Fase IV se han excluido del presente análisis. En cuanto al rendimiento de metano, los valores mostrados en la Figura 6.4 corresponden a los valores promedio obtenidos en las cuatro fases de operación.

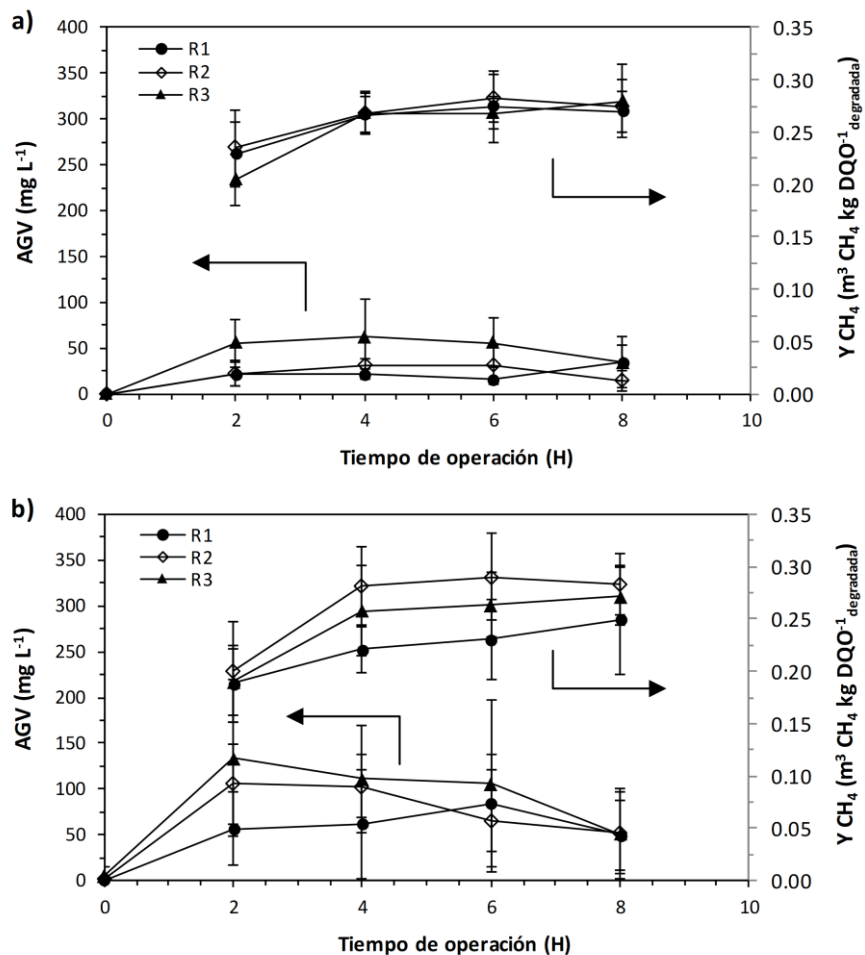


Figura 6.4. Respuesta transitoria de los reactores a la reanudación del suministro de agua residual: a) Concentración de ácidos grasos volátiles y rendimiento de metano tras 8 horas sin alimentación de agua residual, b) Concentración de ácidos grasos volátiles y rendimiento de metano tras 56 horas sin alimentación de agua residual.

Tras los ciclos de 8 horas sin alimentación de agua residual, la concentración de ácidos grasos volátiles mostró el mismo patrón en los tres reactores, aumentando desde valores cercanos a 0 mg L⁻¹ al iniciarse la reanudación del suministro, hasta alcanzar valores máximos después de 2-4 horas de operación, para decrecer posteriormente al finalizar el periodo de seguimiento. En todos los casos, los valores obtenidos fueron inferiores a 75 mg L⁻¹, demostrando una operación

estable en los tres sistemas. Respecto al rendimiento de metano, éste aumentó desde el valor obtenido a las 2 horas de la reanudación de la alimentación, estabilizándose tras 4-6 horas de operación. No se observó ninguna diferencia reseñable entre los tres reactores, alcanzándose un valor alrededor de $0.280 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ 8 horas después de iniciarse el ciclo de operación.

Los periodos de 56 horas sin alimentación de agua residual afectaron en mayor grado a la estabilidad de los reactores. La concentración de ácidos grasos volátiles alcanzó valores en torno a 150 mg L^{-1} durante el periodo transitorio, mostrando una mayor variabilidad respecto a los valores obtenidos tras 8 horas sin alimentación. Asimismo, en comparación con los resultados de rendimiento de metano obtenidos tras interrupciones de 8 horas en la alimentación, las paradas de 56 horas mostraron una recuperación más lenta de los sistemas, con rendimientos a las 2 horas sensiblemente inferiores, y en el caso del reactor R1, con valores menores durante todo el periodo transitorio. Al finalizar el periodo de evaluación, el rendimiento de metano presentó valores promedio de 0.250 , 0.280 y $0.270 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ para los reactores R1, R2 y R3, respectivamente. Lafita et al. (2015) reportaron que periodos de 56 horas sin alimentación de sustrato orgánico afectaron de forma adversa la actividad metanogénica del fango granular de un reactor EGSB alimentado con disolventes orgánicos, obteniendo rendimientos de metano entre un 15 y un 30 % inferiores a los registrados después de periodos cortos de 8 horas sin alimentación de agua residual.

En la Figura 5.5 se ilustra el seguimiento del volumen de metano acumulado para cada reactor UASB durante 106 horas de operación, desde el día 98 hasta el día 102. Para los tres sistemas se observó una producción de metano prácticamente constante durante los periodos con alimentación de agua residual, siendo ligeramente superior la del reactor R2, aquel suplementado con quitosano cada tres semanas. La producción de metano acumulado en este reactor presentó un valor un 9 % superior a la del reactor R1 y un 3 % superior a la del reactor R3. Una vez interrumpida la alimentación de agua residual, la degradación de la materia orgánica remanente en los reactores ocurrió en un lapso de alrededor de 1.5 horas. Esta producción durante los periodos sin alimentación representó entre el 1 y el 3 % de la producción total de metano en un ciclo de operación. Por su lado, la reanudación de la captación de metano al comenzar cada ciclo de operación ocurrió también tras 1.5 horas aproximadamente. Este resultado indica que, durante los periodos sin alimentación de agua residual, continuó la actividad metabólica sin

producirse una acumulación de sustrato orgánico en el medio, y demuestra una adaptación satisfactoria de los sistemas a los ciclos de operación aplicados. En contraste, durante el tratamiento intermitente de aguas residuales de la industria láctea en un patrón de 48 horas con alimentación y 48 horas sin alimentación, Nadais et al. (2005) observaron que un 25 % del metano se produjo en los periodos de suspensión del suministro de agua residual. La interrupción más rápida de la producción de metano en el presente estudio se puede atribuir a las características del sustrato alimentado, compuesto principalmente por etanol, un sustrato fácilmente biodegradable en condiciones anaerobias, en comparación con los sustratos presentes en aguas residuales complejas como las de las industrias lácteas.

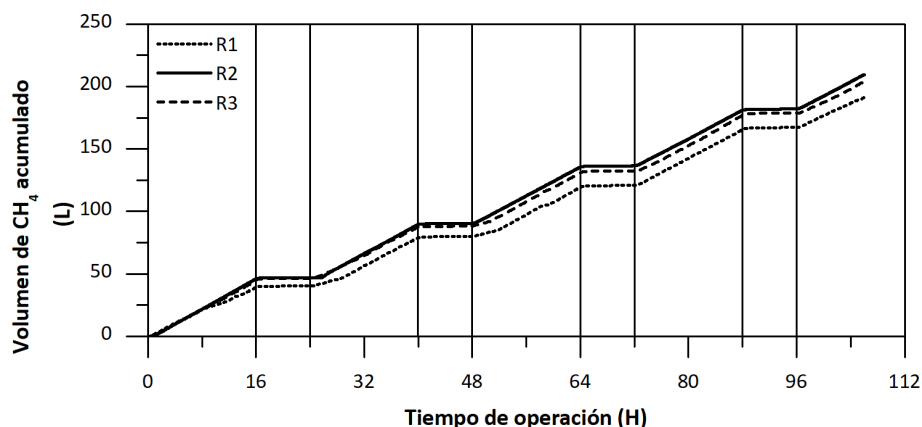


Figura 6.5. Volumen de metano acumulado para cada reactor UASB durante 106 horas de operación intermitente.

6.2.3 Características fisicoquímicas de la biomasa anaerobia

Variación temporal del tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula en reactores de flujo ascendente depende, fundamentalmente, del crecimiento de los microorganismos, del deterioro causado por las fuerzas cortantes y del lavado de biomasa (Alphenaar, 1995). La reanudación de la alimentación del agua residual tras los periodos de

interrupción involucra perturbaciones en las cargas orgánica e hidráulica que podrían afectar al tamaño de los gránulos. En este sentido, el aumento de la producción de biogás y el aumento de la velocidad ascensional del líquido en cada ciclo de operación pueden resultar en una mayor acción abrasiva de las fuerzas de cizalladura, conduciendo al deterioro de la estabilidad estructural de los gránulos y a la variación del tamaño de partícula del fango (Bhunia y Ghangrekar, 2008; O'Flaherty et al., 1997). En la Tabla 6.5 se muestran los resultados correspondientes al porcentaje de gránulos y al diámetro medio de partícula de las muestras tomadas de cada reactor durante el estudio. La variación temporal de la distribución de tamaño de los gránulos de cada reactor se ilustra en la Figura 6.6.

Tabla 6.5. Variación temporal del porcentaje de gránulos y del tamaño medio de partícula de la biomasa de cada reactor UASB.

	Tiempo (d)	Porcentaje de gránulos (%)			Diámetro medio de partícula (μm)		
		R1	R2 ^a	R3	R1	R2 ^a	R3
Fase I	0	73.2	76.0	74.7	498	570	625
	15	73.0	71.7	71.9	496	592	682
	29	72.9	78.3	75.3	469	596	627
	43	56.4	64.3	52.7	341	506	469
Fase II	58	51.4	69.4	54.1	347	589	429
	79	67.6	81.8	71.0	439	614	530
Fase III	100	67.1	63.6	56.4	471	481	419
Fase IV	126	74.8	68.1	55.5	516	526	409
	147	83.8	62.7	56.9	616	401	371

^aReactor con adición de quitosano cada tres semanas.

Durante las cuatro primeras semanas de operación la integridad estructural de los gránulos no se vio afectada, manteniéndose el porcentaje de gránulos y el tamaño medio de partícula en valores ligeramente superiores a los del inicio del estudio. Posteriormente, se observó la flotación de gránulos en la zona de sedimentación de los reactores y el lavado de éstos en el efluente, conllevando la disminución del porcentaje de gránulos con un tamaño superior a 650 μm y, consecuentemente, la disminución del diámetro medio de partícula desde valores de 469, 596 y 627 μm en el día 29, hasta valores de 341, 506 y 469 μm en el día 43 para el fango de los reactores R1, R2 y R3, respectivamente. A partir de este día en

adelante, la velocidad ascensional del líquido en el lecho de fangos se incrementó hasta un valor de 1.0 m h^{-1} a fin de promover el lavado de partículas finas. Dicho

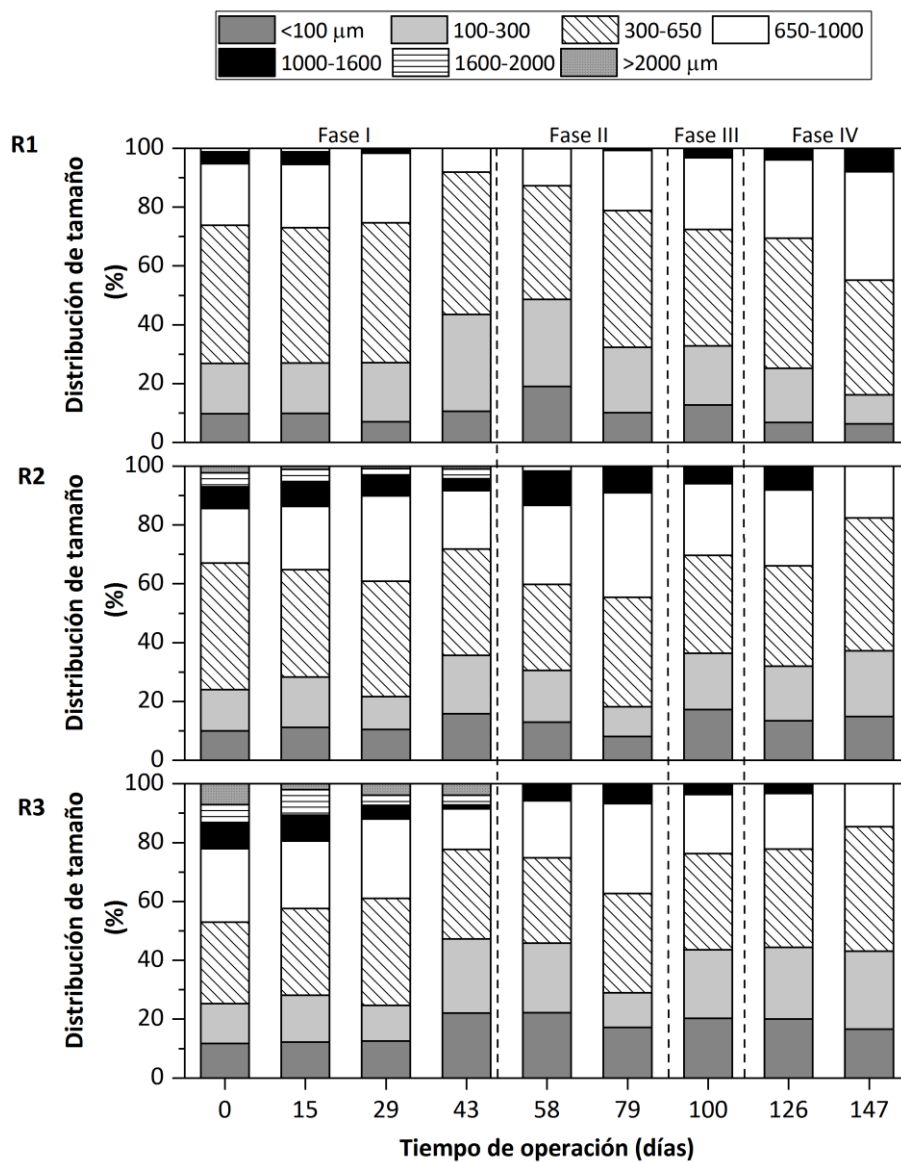


Figura 6.6. Evolución de la distribución de tamaño de partícula en cada reactor.

incremento propició el crecimiento de los gránulos durante la Fase II y, aunque se aumentó la carga orgánica desde 20 hasta $25 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el día 49, en el día

79 se evidenció el aumento del porcentaje de gránulos de los tres reactores, alcanzando valores del 67.6, 81.8 y 71.0 % en los reactores R1, R2 y R3, con un diámetro medio de partícula de 439, 614 y 530 μm , respectivamente.

En el día 100, correspondiente a la Fase III, y operando con una carga orgánica de 35 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$, se observó la disminución del tamaño de partícula del fango de los reactores R2 y R3, mientras que en el reactor R1 se mantuvo en un valor próximo al previo. La disminución del tamaño de partícula se puede relacionar con el mayor esfuerzo cortante procedente de una mayor producción de biogás en estos reactores durante la Fase III (Tabla 6.4), causando la desintegración parcial de los gránulos y el lavado de biomasa. Syutsubo et al. (1997) encontraron que una producción de biogás elevada fue perjudicial para los gránulos de un reactor UASB empleado para el tratamiento de un agua residual procedente de una destilería. Estos autores sugirieron que el aumento de la producción de biogás causado por el incremento de la carga orgánica provocó la ruptura de las células de la superficie de los gránulos, resultando en la erosión de los mismos. No obstante, el reactor R2 fue menos susceptible al lavado de biomasa, tal como se expuso anteriormente, probablemente debido a una mayor retención de sólidos inducida por la adición periódica de quitosano. En la siguiente fase, el porcentaje de gránulos y el tamaño medio de partícula aumentaron en los reactores R1 y R2, mientras que en el reactor R3 los valores de ambos parámetros fueron semejantes a los de la fase previa. Finalmente, la alta carga orgánica de 75 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ aplicada a los reactores R2 y R3 al término de la Fase IV condujo a la disminución del tamaño de partícula de ambos reactores, especialmente del porcentaje de gránulos con un tamaño superior a 650 μm .

Los resultados obtenidos permiten concluir que en los sistemas se produjo un balance dinámico entre el deterioro y el lavado de gránulos con un tamaño superior a 650 μm , y el crecimiento de gránulos y de partículas con un tamaño inferior, favoreciendo el mantenimiento de un alto porcentaje de gránulos durante la operación intermitente de los reactores. No obstante, los sistemas se mostraron susceptibles a la flotación y al lavado de biomasa cuando la carga orgánica se incrementó hasta un valor específico. Así, para el reactor R1, la aplicación de una carga orgánica intermitente de hasta 35 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ no afectó a la integridad estructural de los gránulos, e incluso al finalizar el estudio, se observó un aumento del tamaño de los gránulos respecto al valor inicial. Para el reactor R2, operando hasta una carga orgánica de 50 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$, el diámetro medio de partícula y el

porcentaje de gránulos fueron superiores a los del reactor R1. La adición periódica de quitosano pudo promover la adhesión de partículas finas pese al esfuerzo cortante propiciado por la carga orgánica aplicada y la producción de biogás resultante. Cargas orgánicas superiores a $25 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ afectaron adversamente el fango del reactor R3, resultando en una mayor flotación y/o desintegración de los gránulos, con una disminución progresiva del diámetro medio de partícula hasta alcanzar una reducción del 41 % operando a $75 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. El detrimento de la integridad estructural de los gránulos de este reactor condujo, posiblemente, a la acumulación de ácidos grasos volátiles durante la Fase IV al aplicarse una carga orgánica de $50 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Figura 6.1b). La desintegración de los gránulos puede derivar en la acumulación de ácidos grasos volátiles debido a la alteración de las microcolonias de microorganismos sintróficos —bacterias acetogénicas y metanógenos hidrogenotróficos— que guardan una estrecha relación entre sí y cuya interacción se ve favorecida por la formación de agregados (Schink, 1997; Shen et al., 2016). Dicha alteración puede derivar en una menor transferencia del hidrógeno o del formiato, afectando con ello a la degradación del sustrato alimentado y de los productos intermediarios que requieren bajas presiones parciales de estos compuestos para su conversión en el proceso anaerobio (Kundu et al., 2013; Schmidt y Ahring, 1995).

Producción de sustancias poliméricas extracelulares

En este estudio se evaluaron dos fracciones de las sustancias poliméricas extracelulares a lo largo del experimento: las EPS fuertemente unidas al fango (EPS-F) y las EPS en el licor de mezcla o EPS solubles (EPS-S), junto con su contenido de proteínas y polisacáridos. En la Tabla 6.6 se presenta la variación temporal de la producción de sustancias poliméricas extracelulares del fango de cada reactor UASB.

En todas las muestras analizadas las EPS se cuantificaron en mayor proporción en la fracción fuertemente unida al fango (EPS-F). Estos componentes de las EPS se han identificado como la matriz estructural de los gránulos que media la cohesión y la adhesión entre las células, mientras que las EPS solubles (EPS-S) se encuentran distribuidas en el seno de la solución (Lu et al., 2015a). La mayor fracción de EPS-F es un indicativo de gránulos con mayor resistencia y estabilidad mecánica para soportar las perturbaciones externas a las que se someten los gránulos en un sistema de tratamiento anaerobio, y en este caso concreto, a la variación de la carga hidráulica

Tabla 6.6. Variación temporal de la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en los reactores UASB.

EPS-F (mg g SSV ⁻¹)		R1			R2			R3		
	(días)	PN	PS	Total	PN	PS	Total	PN	PS	Total
Fase I	0	102.7	18.0	120.7	124.9	16.9	141.8	152.0	31.6	183.6
	29	101.4	15.7	117.1	141.3	17.2	158.5	78.8	46.1	124.9
Fase II	58	148.0	19.8	167.8	159.5	35.4	194.8	109.5	73.4	182.9
Fase III	100	110.0	40.9	150.9	142.8	29.8	172.6	173.7	34.1	207.8
Fase IV	126	107.0	21.1	128.0	149.3	33.0	182.4	176.6	41.6	218.2
	147	167.5	30.3	197.8	140.2	27.1	167.3	71.2	37.8	109.0

EPS-S (mg g SSV ⁻¹)		R1			R2			R3		
	(días)	PN	PS	Total	PN	PS	Total	PN	PS	Total
Fase I	0	25.0	23.7	48.7	47.2	12.3	59.5	69.4	9.7	79.1
	29	58.3	11.4	69.7	55.7	13.3	69.0	64.3	15.6	79.9
Fase II	58	56.8	14.8	71.6	61.2	20.5	81.7	53.0	8.8	61.8
Fase III	100	45.6	12.6	58.2	37.8	10.3	48.0	13.2	2.9	16.1
Fase IV	147	35.0	13.2	48.2	21.8	8.97	30.8	26.2	12.4	38.7

y de la carga orgánica durante los ciclos de operación. Los valores de las EPS-F de prácticamente todas las muestras de fango de los reactores R1 y R2 fueron superiores a los valores obtenidos para cada inóculo; mientras que los valores correspondientes al fango del reactor R3 se mostraron algo más inestables, disminuyendo y aumentando en el transcurso del experimento. La muestra del reactor R3 en el día 147 presentó un valor dos veces inferior al obtenido en la determinación previa (día 126), aspecto relacionado con un menor contenido de proteínas, y coincidente con la disminución del tamaño de partícula y de la pérdida de la estabilidad estructural en este reactor al finalizar el estudio. En cuanto a la fracción de EPS-S, en líneas generales, se observó la misma dinámica en los tres reactores, aumentando en las primeras fases del experimento y disminuyendo conforme aumentó la carga orgánica. En este estudio no se observó una relación entre la variación de la distribución de tamaño de partícula y el contenido de las EPS del fango de los tres reactores. Así, por ejemplo, para el reactor R3, el diámetro medio de partícula disminuyó desde un valor inicial de 625 μm hasta un valor de 429 μm en el día 58, aunque la producción de EPS-F se mantuvo en 183 mg g SSV⁻¹ y la de EPS-S disminuyó desde 79 hasta 62 mg g SSV⁻¹. En contraste, en un estudio en el que se

evaluó la depuración de un agua residual contaminada con metanol como única fuente de carbono, Lu et al. (2015a) encontraron que el contenido de EPS-F del fango granular decreció tras 238 días de operación, mientras que la fracción EPS-S aumentó, señalando ésta como una de las causas que propició la ruptura de los gránulos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que otros factores operacionales y/o ambientales podrían estar involucrados en la desintegración y/o flotación de los gránulos durante la operación intermitente. Ding et al. (2015) indicaron que la pérdida de la estabilidad de los agregados no se encuentra necesariamente relacionada con la secreción de EPS, sino que también podría ser un mecanismo de los microorganismos para sobrevivir en condiciones ambientales estresantes. En condiciones de inanición, por ejemplo, la desintegración de los gránulos podría ocurrir para facilitar el acceso al sustrato a los microorganismos en el interior del gránulo. La flotación de gránulos observada durante la operación de los reactores también podría estar relacionada con la limitación de sustrato orgánico en los períodos sin alimentación de agua residual. Puesto que la mayoría del sustrato se utiliza cerca de la superficie de los gránulos, la menor concentración de sustrato disponible en el medio durante las interrupciones de la alimentación podría conllevar la limitación al interior de los gránulos, resultando en la lisis celular y en la obtención de gránulos huecos propensos a flotar (Abbasi y Abbasi, 2012; W. Li et al., 2014).

En cuanto a la composición de las EPS, el contenido de proteínas (PN) fue superior que el contenido de polisacáridos (PS) en ambas fracciones. En varios estudios se ha indicado que durante el tratamiento de sustratos metanogénicos y acetogénicos, la producción de polisacáridos es limitada, de modo que la producción de proteínas desempeña un papel más importante para la formación y la estabilidad estructural de los gránulos (Hudayah et al., 2012; Schmidt y Ahring, 1994; Tay et al., 2000). Estos resultados son consistentes, además, con los resultados obtenidos en el estudio de formación de biomasa con alimentación continua (Capítulo 5), en el que el contenido de proteínas de los tres fangos analizados fue también superior al contenido de polisacáridos.

6.2.4 Análisis de las comunidades microbianas

En esta sección se detallan los resultados correspondientes al análisis de las comunidades microbianas del fango de los tres reactores UASB y su dinámica durante la realización del estudio. La evaluación de las comunidades microbianas se llevó a cabo aplicando las técnicas biología molecular DGGE y secuenciación de alto rendimiento.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

La caracterización de las poblaciones microbianas presentes en el fango de los reactores durante las diferentes fases del estudio se realizó mediante DGGE. En la Figura 6.7 se presentan los perfiles de bandas obtenidos de las poblaciones de arqueas (Figura 6.7a) y de bacterias (Figura 6.7b) de las muestras de biomasa extraídas de cada reactor. Las bandas que se indican en la figura fueron aisladas para su secuenciación e identificación. En la Tabla 6.7 se muestra la designación de las bandas de arqueas y de bacterias, la identificación de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas junto con el porcentaje de similitud en relación con las secuencias de la base de datos GenBank, el número de acceso y su afiliación filogenética.

En las poblaciones del dominio Arquea de los tres reactores se observó la predominancia de 5 bandas, de las cuales tres se relacionaron con metanógenos hidrogenotróficos (A1, A3 y A4) y dos con metanógenos acetoclásticos (A2 y A5). La población de arqueas del reactor R1 permaneció prácticamente estable durante el estudio, pese a la operación intermitente y a la variación de las condiciones operacionales. Por otra parte, las comunidades de arqueas de los reactores R2 y R3 presentaron una ligera variación correspondiente a una mayor diversidad respecto a la observada en el inóculo y a la del reactor R1. De acuerdo con Kundu et al. (2013), una mayor diversidad de arqueas puede desempeñar un papel importante en el rendimiento de reactores anaerobios sujetos a variaciones en la carga orgánica. De modo que el mayor rendimiento de ambos reactores operando a altas cargas orgánicas podría estar relacionado con la mayor diversidad de arqueas.

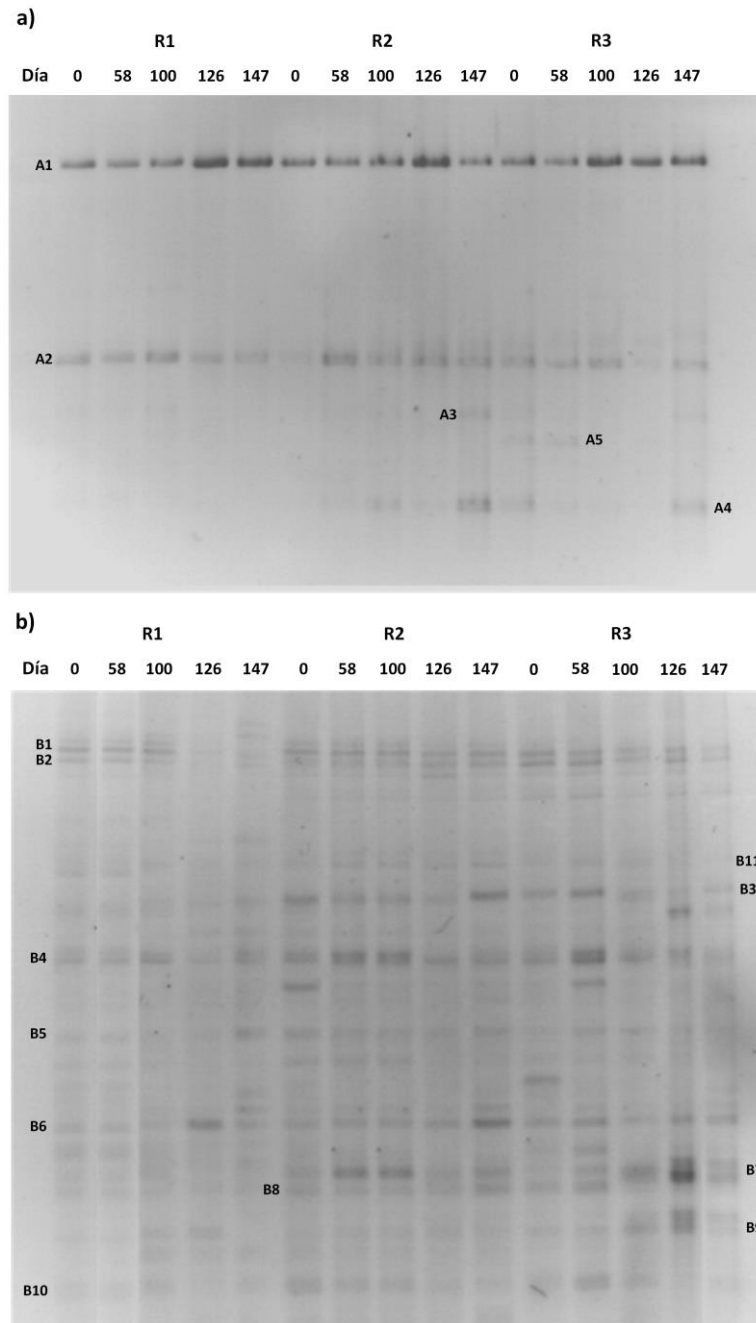


Figura 6.7. Variación temporal de los perfiles de DGGE de la biomasa extraída de los tres reactores a) DGGE de arqueas y b) DGGE de bacterias.

Tabla 6.7. Identificación, porcentaje de similitud y afiliación filogenética de las bandas de arqueas y bacterias aisladas de los perfiles de DGGE y secuenciadas.

Banda	Microorganismo más cercano	Número de acceso	PS %	Grupo filogenético
A1	<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	NR_074173.1	100	<i>Methanomicrobiales/Methanocorpusculaceae</i>
A2	<i>Methanoseta concilii</i>	NR_102903.1	100	<i>Methanosarcinales/Methanosetaeaceae</i>
A3	<i>Methanobacterium formicicum</i>	NR_115168.1	100	<i>Methanobacteriales/Methanobacteriaceae</i>
A4	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	NR_042783.1	99	<i>Methanobacteriales/Methanobacteriaceae</i>
A5	<i>Methanoseta harundinacea</i>	NR_043203.1	99	<i>Methanosarcinales/Methanosetaeaceae</i>
B1	<i>Paludibacter propionigenes</i>	NR_074577.1	89	<i>Bacteroidetes/Bacteroidales</i>
B2	<i>Capnocytophaga haemolytica</i>	NR_113562.1	84	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriales</i>
B3	<i>Clostridium limosum</i>	NR_104825.1	91	<i>Firmicutes/Clostridiales</i>
B4	<i>Pelobacter propionicus</i>	NR_074975.1	98	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B5	<i>Geobacter chapellei</i>	NR_025982.1	96	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B6	<i>Geobacter psychrophilus</i>	NR_043075.1	88	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B7	<i>Acetobacterium woodii</i>	NR_026324.1	100	<i>Firmicutes/Clostridiales</i>
B8	<i>Bifidobacterium hapali</i>	NR_147762.1	93	<i>Bacteroidetes/Bifidobacteriales</i>
B9	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	NR_102940.1	88	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriales</i>
B10	<i>Geobacter uraniireducens</i>	NR_074940.1	91	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B11	<i>Bifidobacterium longum</i>	NR_145535.1	98	<i>Bacteroidetes/Bifidobacteriales</i>

PS: porcentaje de similitud.

Las bandas predominantes en los tres reactores UASB durante el estudio fueron las bandas A1 y A2, las cuales presentaron similitud idéntica con *Methanocorpusculum labreanum* y *Methanosaeta concilii*, respectivamente. Ambos microorganismos permanecieron en las muestras analizadas en las diferentes fases del estudio y no se vieron afectados por el incremento de la carga orgánica o el patrón de alimentación intermitente aplicado. Los microorganismos pertenecientes al género *Methanocorpusculum* producen metano a partir de H₂-CO₂ y formiato, y algunas especies pueden emplear isopropanol-CO₂ (Zellner et al., 1987). Estos microorganismos hidrogenotróficos se han identificado como predominantes en reactores de alta carga que operaban a bajas temperaturas (Bialek et al., 2012a; O'Reilly et al., 2010) y/o con tiempos de retención hidráulicos bajos, inferiores a 2 días (Luo et al., 2016). Por otra parte, *Methanosaeta* es un metanógeno acetoclástico descrito como el productor de metano predominante en la tierra (Smith y Ingram-Smith, 2007). Los microorganismos pertenecientes al género *Methanosaeta* se han identificado ampliamente en el fango granular de reactores anaerobios alimentados con diversos sustratos (Leclerc et al., 2004; McHugh et al., 2003a; Sudmalis et al., 2018), y su papel en la formación y el mantenimiento de los gránulos es considerado clave, actuando como núcleos para la iniciación de la adhesión microbiana y formando una matriz que favorece la aglomeración de otros microorganismos (Gagliano et al., 2018; Hulshoff Pol et al., 2004; Tay et al., 2010). La prevalencia de ambas poblaciones de microorganismos hidrogenotróficos y acetoclásticos explica el alto rendimiento de los reactores en cuanto a la degradación del sustrato orgánico y a la baja concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente (Figura 6.1b) al aplicar cargas orgánicas entre 35 y 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

La banda A5, que se detectó sólo en el reactor R3 en las muestras correspondientes a los días 0 y 58, también se identificó como un microorganismo perteneciente al género *Methanosaeta*, *Methanosaeta harundinacea*. Esta arquea metanogénica generalmente se presenta en forma de bacilos individuales o en pares y de filamentos (Ma et al., 2006). Su morfología filamentosa ha sido considerada importante en la formación de biopelículas y gránulos en reactores de lecho granular (Li et al., 2015; Sudmalis et al., 2018). El incremento de la carga orgánica junto con el lavado de biomasa resultante puede haber causado la desaparición de este microorganismo, y podría encontrarse relacionado con el deterioro de las características granulares del fango del reactor R3, ya que otros autores han reportado la desaparición de células de *Methanosaeta* como una causa

de la dispersión o de la ruptura de los gránulos en reactores UASB (Lu et al., 2015a; McHugh et al., 2003b).

Las bandas A3 y A4 se identificaron como arqueas pertenecientes al orden *Methanobacteriales*. La banda A3 se relacionó con *Methanobacterium formicicum* y se detectó en el reactor R2 operando a una carga orgánica de 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Las especies del género *Methanobacterium* son metanógenos hidrogenotróficos que han sido identificados en gránulos que trataban diferentes tipos de aguas residuales a temperaturas bajas y mesofílicas (Bialek et al., 2012b; Nakasaki et al., 2013; Schmidt y Ahring, 1996; Wang et al., 2015), incluyendo aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos (Bravo et al., 2017). Durante el tratamiento de residuos porcinos prehidrolizados, Wang et al. (2015) observaron la predominancia de especies de *Methanobacterium* cuando la carga orgánica se aumentó drásticamente desde 3 hasta 21 kg DQO m⁻³ d⁻¹. La banda A4 corresponde a *Methanobrevibacter arboriphilus*, un metanógeno hidrogenotrófico que usa como único sustrato para su crecimiento H₂-CO₂ (Janssen et al., 2009). Este microorganismo se detectó en los reactores R2 y R3 cuando se aplicaron altas cargas orgánicas. Los metanógenos hidrogenotróficos se caracterizan por poseer una velocidad máxima de crecimiento específico superior a la de los metanógenos acetoclásticos (van Lier et al., 2008), lo cual, probablemente, conllevó un aumento de las poblaciones de metanógenos consumidores de hidrógeno al aplicar altas cargas orgánicas (Wang et al., 2015). Los resultados obtenidos son consistentes con otros estudios en los que se ha demostrado que los metanógenos hidrogenotróficos desempeñan un papel importante en la producción de metano en reactores anaerobios de lecho granular que operan bajo perturbaciones en la carga orgánica aplicada (Luo et al., 2016; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2013). No obstante, atendiendo a la prevalencia de las poblaciones de microorganismos predominantes en los tres reactores en el análisis de los patrones de bandas, se puede considerar que las comunidades de arqueas se vieron poco afectadas por la operación intermitente o por los cambios en la carga orgánica.

Respecto a la evaluación de las comunidades de bacterias, un total de 11 bandas se aislaron del gel de DGGE y se secuenciaron para su identificación (Figura 6.7). El mayor número de bandas observado en el análisis de las poblaciones del dominio Bacteria demuestra una mayor diversidad respecto al dominio Arquea. Las bandas predominantes parecen mantenerse en todas las muestras evaluadas, aunque con una intensidad variable. El filo *Bacteroidetes* estuvo representado por

las bandas B1, B2, B8, B9 y B11. Los microorganismos que se agrupan en este filo se encuentran frecuentemente en reactores anaerobios (O'Reilly et al., 2010) en los que participan en las etapas de hidrólisis y acidogénesis del proceso de degradación anaerobia (Regueiro et al., 2012). Estos microorganismos se identificaron en el inóculo de los tres reactores UASB y permanecieron en la mayoría de las muestras analizadas, aunque la intensidad de algunas de las bandas que los representan fue muy débil en el fango de los reactores R1 y R3 conforme avanzó el estudio. A modo de ejemplo, las bandas B1, B2 y B11 casi desaparecieron al final de estudio en el reactor R1, y la banda B11 fue imperceptible en el reactor R3. Este resultado demuestra un impacto diferente del patrón de alimentación de agua residual y de la variación de la carga orgánica en el fango granular del R2, para el cual la adición de quitosano pudo promover la retención de microorganismos, incluidas bacterias fermentativas.

Las bandas B3 y B7 se relacionaron con el filo *Firmicutes* y, a nivel de orden, con el orden *Clostridiales*. La banda B3 se identificó como *Clostridium* sp, bacterias fermentativas cuya presencia es común en ambientes metanogénicos (Diaz et al., 2006). La banda B7 presentó una similitud idéntica con la bacteria homoacetogénica *Acetobacterium woodii* (Diekert y Wohlfarth, 1994). Algunas especies del género *Acetobacterium* pueden llevar a cabo la degradación de ésteres de metilo para formar metanol y el correspondiente ácido carboxílico (Diekert y Wohlfarth, 1994), y pueden realizar la escisión enzimática del enlace éter de algunos éteres de glicol como el 2-fenoxietanol o el polietilenglicol (Schramm y Schink, 1991; Speranza et al., 2002). La presencia de *Acetobacterium* sp. en el fango anaerobio de los tres reactores podría estar asociada a la degradación del éster acetato de etilo y del éter de glicol 1-etoxi-2-propanol, ambos componentes de la mezcla ternaria alimentada a los sistemas.

La banda B4 presentó similitud con *Pelobacter propionicus*, una bacteria anaerobia estricta capaz de fermentar etanol con propionato y acetato como productos principales (Schink et al., 1987). *P. propionicus* se identificó previamente en un reactor EGSB empleado para el tratamiento de disolventes orgánicos de la industria flexográfica (Bravo et al., 2017). Las bandas B5, B6 y B10 se identificaron como especies del género *Geobacter*. Las especies de este género degradan sustratos como etanol y acetato junto con la reducción de óxidos de hierro y manganeso, y crecen bajo temperaturas mesofílicas, aunque el microorganismo correspondiente a la banda B6, *Geobacter psychrophilus*, presenta un crecimiento

óptimo en el intervalo de temperatura de 17 a 30 °C (Nevin et al., 2005; Shelobolina et al., 2008). Como se manifestó en la sección 5.2.4, las especies del género *Geobacter* predominan en el fango granular de reactores anaerobios empleados para el tratamiento de aguas residuales que contienen etanol, ya sean aguas residuales sintéticas (Bravo et al., 2017; Xing et al., 2017; Zhao et al., 2016) o aguas residuales procedentes de industrias cerveceras (Shrestha et al., 2014), participando en la producción de metano en asociación sintrófica con otros microorganismos como *Methanosaeta* mediante el mecanismo de transferencia de electrones entre especies. Los microorganismos descritos anteriormente, pertenecientes al filo *Proteobacteria*, también se identificaron como predominantes en el estudio con alimentación continua de sustrato orgánico y prevalecieron en el presente estudio, lo cual indica su funcionalidad en la degradación del agua residual sintética de interés.

Secuenciación de alto rendimiento

Con el propósito de obtener información adicional acerca de la estructura de las comunidades microbianas del fango de los tres reactores UASB después de 147 días de operación bajo alimentación intermitente del agua residual, se realizó la secuenciación de alto rendimiento de las muestras de ADN correspondientes al inóculo de cada reactor y a las muestras de fango del final del estudio. En la Figura 6.8 se ilustra la estructura de las comunidades microbianas de los tres reactores a nivel de filo (Figura 6.8a) y de género (Figura 6.8b) para los grupos con una abundancia relativa superior al 1 % en al menos una de las muestras analizadas.

Los filios más abundantes en todas las muestras analizadas fueron *Proteobacteria* y *Euryarchaeota*, de manera consistente con el estudio de Xing et al. (2017) en el que ambos filios dominaron en el fango granular de un reactor ASBR que trataba un agua residual contaminada con etanol, con abundancias relativas del 45.9 y el 27.4 %, respectivamente. En el presente estudio, la abundancia relativa del filo *Proteobacteria* aumentó significativamente desde valores entre el 16.6 y el 23.3 % en los inóculos, hasta valores del 54.5 % en el reactor R1, 33.4 % en el reactor R2 y 31.7 % en el reactor R3 tras 147 días de operación. Los microorganismos pertenecientes al filo *Proteobacteria* existen ampliamente en sistemas de tratamiento de aguas residuales realizando la degradación de diversos tipos de sustratos orgánicos (Song et al., 2017). Especies pertenecientes a este filo, específicamente de la clase *Deltaproteobacteria*, pueden llevar a cabo la degradación

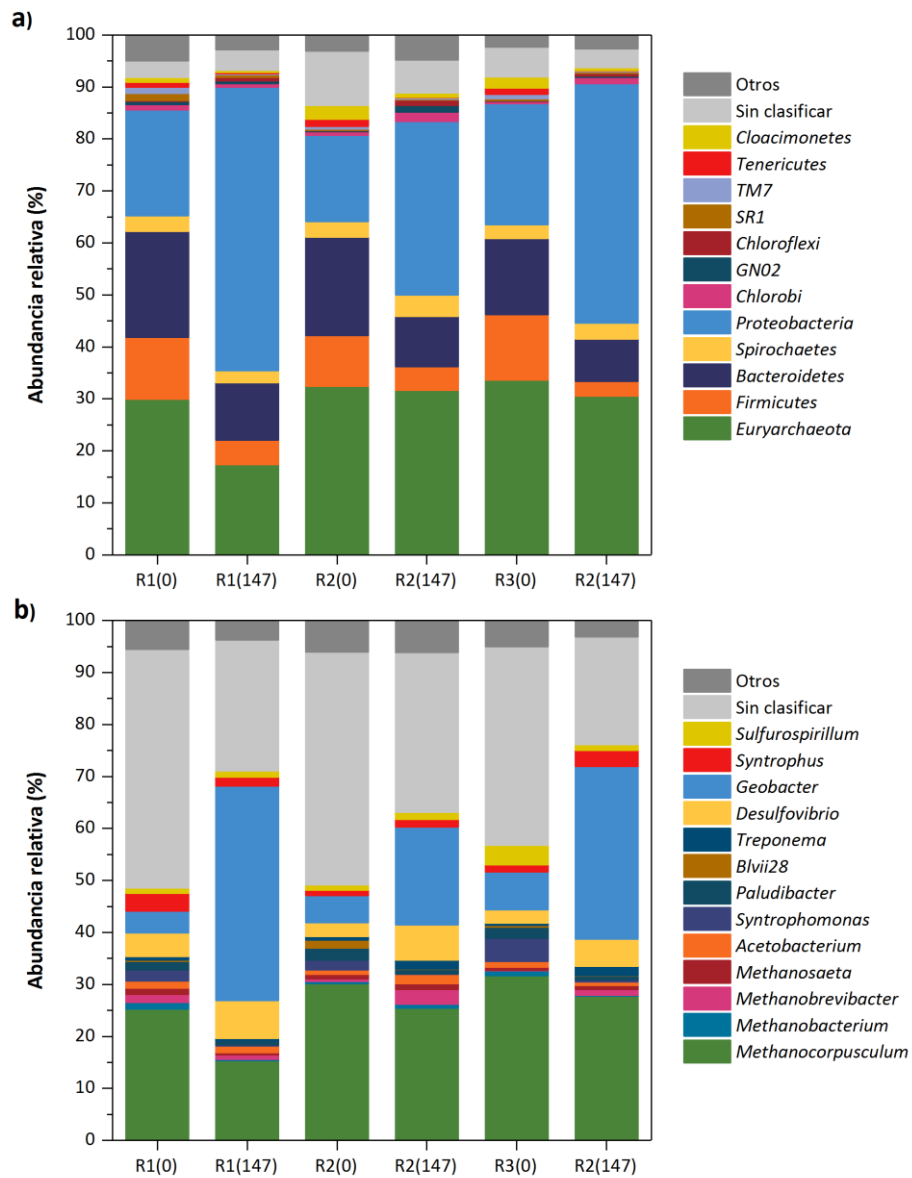


Figura 6.8. Estructura de las comunidades microbianas a nivel de a) filo y b) género de las muestras correspondientes a cada inóculo y de las muestras de los tres reactores al finalizar el estudio en el día 147.

del etanol y de ácidos grasos volátiles en reactores metanogénicos (Sieber et al., 2012; Xing et al., 2017). El aumento de la abundancia relativa de este filo en los tres sistemas podría estar relacionado con el incremento en la carga orgánica aplicada y, por tanto, la mayor disponibilidad de etanol en el medio. Por otra parte, la abundancia relativa del filo *Euryarchaeota*, que incluye a las arqueas metanogénicas, permaneció en valores alrededor del 30 % en los reactores R2 y R3, mientras que en el reactor R1 decreció a un valor del 17.4 %. Así, la menor abundancia de metanógenos en el fango del reactor R1 en comparación con los otros reactores podría explicar la menor capacidad de eliminación y la acumulación de ácidos grasos volátiles que se observó al aumentar la carga orgánica hasta un valor de 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Otros filios abundantes en el fango de los tres reactores fueron *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, con abundancias relativas en el intervalo de 8.2-11.0 %, y 2.8-4.7 %, respectivamente. La predominancia de ambos filios se ha reportado en reactores metanogénicos que tratan altas cargas orgánicas (Luo et al., 2016; Wang et al., 2015), participando en la hidrólisis y la fermentación de compuestos orgánicos complejos (Gomes de Barros et al., 2017; Kampmann et al., 2012). Un aspecto a destacar es la disminución de la abundancia relativa de estos filios respecto al inóculo de cada reactor tras 147 días de operación. La ventaja competitiva de otras bacterias capaces de llevar a cabo la degradación del agua residual sintética, compuesta principalmente por etanol, un sustrato que no precisa de una etapa de hidrólisis, pudo conllevar la disminución de su abundancia. La mayor concentración de ácidos grasos volátiles en la Fase IV del estudio también pudo contribuir a la disminución de la presencia de estos microorganismos (Luo et al., 2016).

A nivel de género (Figura 6.8b), las bacterias electrogénicas pertenecientes a *Geobacter* fueron predominantes al final del experimento con abundancias relativas en el intervalo de 18.9 a 41.2 % del total de las secuencias de los tres reactores. Las bacterias sulfatoreductoras del género *Desulfovibrio* también fueron abundantes en los tres sistemas, con valores del 7.3 % en el reactor R1, 6.8 % en el reactor R2 y 5.3 % en el reactor R3. Las especies del género *Desulfovibrio* pueden crecer en asociación sintrófica con metanógenos hidrogenotróficos para la degradación de sustratos como etanol y lactato (Chen et al., 2014; Shen et al., 2016), además de realizar la oxidación del etanol o el hidrógeno acoplada con la reducción de sulfato, siendo capaces de cambiar entre el metabolismo sintrófico y el sulfurogénico (Meyer et al., 2013). La presencia de ambos géneros, *Geobacter* y *Desulfovibrio*, se

ha identificado en la estructura bacteriana de reactores anaerobios empleados para la depuración de aguas residuales contaminadas con etanol (Shrestha et al., 2014; Xing et al., 2017; Zhao et al., 2016). La abundancia relativa de estos microorganismos aumentó considerablemente después de 147 días de operación, lo cual indica su capacidad de adaptación a las condiciones operacionales aplicadas para la degradación del sustrato orgánico.

La abundancia de otros microorganismos como *Paludibacter* y *Syntrophomonas*, pertenecientes a los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, respectivamente, disminuyó a valores inferiores al 0.5 % al finalizar el experimento en los tres reactores. La disminución de la abundancia relativa de estos microorganismos sugiere que la alimentación intermitente de agua residual y/o la alta carga orgánica aplicada durante el experimento indujo una presión selectiva en estas comunidades microbianas. Además, el dominio de comunidades sintróficas de microorganismos consumidores de etanol sugiere que éstas fueron menos sensibles a las condiciones operacionales aplicadas. El mantenimiento de la estructura granular del fango pudo propiciar el crecimiento de microorganismos sintróficos, favoreciendo a su vez la velocidad de degradación del sustrato alimentado. La prevalencia de comunidades sintróficas en condiciones de estado no estacionario ha sido reportada en algunos estudios (Demirel y Scherer, 2008; Kundu et al., 2013). El sustrato orgánico también pudo ejercer una selección microbiana en el fango granular de los reactores. En este sentido, los microorganismos sintróficos como *Syntrophomonas*, que realizan la degradación de ácidos grasos de cadena larga en asociación sintrófica con metanógenos hidrogenotróficos (McInerney et al., 2008), casi desaparecieron al finalizar el estudio probablemente por la exposición del fango a un agua residual sintética con una composición más sencilla.

La estructura de las comunidades de arqueas a nivel de género demostró que *Methanocorpusculum* fue el metanógeno más abundante en el fango de los tres reactores al finalizar el estudio con abundancias relativas de 15.4, 25.5 y 27.8 % del total de las secuencias de los reactores R1, R2 y R3, respectivamente. *Methanosaeta* presentó una abundancia relativa en el intervalo comprendido entre el 0.4 y 1.1 %, similar a la observada en los ensayos en continuo, indicando que la presencia de *Methanosaeta* no se vio afectada por las condiciones de operación evaluadas. Song et al. (2010) también observaron la predominancia de metanógenos hidrogenotróficos en el fango granular de un reactor UASB a escala piloto que trataba aguas residuales porcinas. En su estudio, aunque la familia

Methanosaetaceae no presentó un crecimiento significativo tras 382 días de operación, su prevalencia contribuyó al mantenimiento de la estructura granular del fango y a la capacidad de tratamiento del reactor. Otras arqueas presentes en los tres reactores fueron las pertenecientes a los géneros *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*, también identificados mediante DGGE, cuyas abundancias relativas estuvieron en el intervalo de 0.2 a 0.8 %, y de 0.8 a 2.8 %, respectivamente, con valores superiores para el reactor R2 al que se adicionó quitosano periódicamente.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la operación bajo condiciones de alimentación intermitente de sustrato y la carga orgánica aplicada ejercieron cierta presión selectiva en la estructura de las comunidades microbianas de los reactores UASB, ya que, aunque los microorganismos predominantes en cada inóculo prevalecieron durante el estudio, su abundancia relativa varió, particularmente la de las poblaciones de bacterias, en cuyo análisis se observó una sucesión hacia microorganismos acetogénicos capaces de efectuar un metabolismo sintrófico, principalmente *Geobacter*. Esta presión selectiva fue menor en el reactor R2, al cual se adicionó quitosano periódicamente, y superior en el reactor R1, cuyos gránulos se obtuvieron en el ensayo presentado en el Capítulo 5 sin la adición del polímero.

Como en el estudio anterior, no se identificaron microorganismos metanogénicos capaces de utilizar el etanol, disolvente mayoritario en el agua residual, para la producción de metano. Este hecho, junto con el predominio de metanógenos hidrogenotróficos, corrobora que la degradación del agua residual se produjo mediante asociaciones sintróficas. De hecho, la baja concentración de ácidos grasos volátiles operando con cargas orgánicas de hasta 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹, y la predominancia de los metanógenos hidrogenotróficos (*Methanocorpusculum*, *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*) sobre los acetoclásticos (*Methanosaeta*), aun cuando el sustrato orgánico alimentado consistió, en su mayoría, en un sustrato acetogénico como el etanol, sugiere que la oxidación sintrófica de acetato pudo tener lugar en la conversión del sustrato hasta metano.

Para aclarar la hipótesis de esta vía cabe mencionar que el acetato es el principal precursor de la producción de metano durante la conversión anaerobia de la materia orgánica. Se han descrito dos mecanismos para la formación de metano a partir de acetato. El primero de ellos corresponde a la ruta de la metanogénesis

acetoclástica, la cual es realizada por microorganismos de las familias *Methanosarcinaceae* y *Methanosaetaceae* (Karakashev et al., 2006; Liu y Whitman, 2008). El segundo mecanismo procede mediante la oxidación sintrófica que implica una reacción en dos etapas en las que el acetato se oxida hasta hidrógeno y dióxido de carbono y, posteriormente, estos productos se convierten en metano (Stams, 1994). Este último mecanismo es realizado por bacterias que oxidan acetato en asociación sintrófica con metanógenos hidrogenotróficos (Karakashev et al., 2006). Según Schnürer et al. (2008), los altos niveles de amoníaco formados durante la degradación anaerobia de materia orgánica rica en proteínas puede regular el cambio de la metanogénesis acetoclástica hacia la oxidación sintrófica de acetato, probablemente como consecuencia del efecto inhibitorio del amonio en los metanógenos acetoclásticos (Song et al., 2010; Westerholm et al., 2011). No obstante, la concentración de acetato, la velocidad de dilución y la presencia de la familia *Methanosaetaceae*, se han sugerido como otros factores involucrados en el desarrollo de la oxidación sintrófica de acetato (Shigematsu et al., 2004; Westerholm et al., 2011). La mayoría de las bacterias capaces de realizar este mecanismo se han enmarcado en el grupo fisiológico de homoacetógenos (Westerholm et al., 2016). Bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes* como *Clostridium* ssp., *Thermacetogenium phaeum* y *Syntrophaceticus schinkii*, y al filo *Proteobacteria* como *Geobacter sulfurreducens*, son conocidas por llevar a cabo la oxidación sintrófica del acetato (Cord-Ruwisch et al., 1998; Luo et al., 2016; Westerholm et al., 2016).

6.3 CONCLUSIONES

En el estudio presentado en este capítulo se ha evaluado la robustez del tratamiento anaerobio de un agua residual sintética contaminada con disolventes orgánicos bajo condiciones de alimentación intermitente, analizándose el efecto del patrón intermitente de alimentación en las características fisicoquímicas y microbiológicas del fango granular. El estudio se ha realizado en tres reactores UASB operando a temperatura ambiente y alimentados 16 horas al día durante 5 días a la semana con un agua residual sintética contaminada con etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol. Las siguientes son las conclusiones principales del análisis de los resultados obtenidos.

El reactor UASB es una configuración de reactor anaerobio de alta carga apropiada para realizar el tratamiento intermitente de un agua residual sintética contaminada con los disolventes orgánicos de interés industrial ensayados, alcanzando eficacias de eliminación superiores al 94 % y una operación estable con una carga orgánica intermitente de hasta 50 kg DQO m⁻³ d⁻¹. El incremento de la carga orgánica hasta un valor de 75 kg DQO m⁻³ d⁻¹ produjo un desequilibrio del proceso de degradación con la acumulación de ácidos grasos volátiles, conllevando la acidificación de los reactores y la reducción de la eficacia de eliminación de la materia orgánica.

La alimentación intermitente del agua residual afectó el rendimiento de metano de los reactores, obteniéndose valores inferiores a los registrados durante la operación con alimentación continua del agua residual de interés. No obstante, la adición periódica de quitosano mostró un efecto positivo sobre la actividad metanogénica específica del fango granular, obteniéndose en este estudio una mejora entre el 12 y 15 % respecto a los reactores a los que no se añadió el polímero. Asimismo, la adición de quitosano promovió la retención de biomasa bajo condiciones de alimentación intermitente de agua residual, siendo en este estudio el lavado de partículas entre el 56 y el 64 % inferior en el reactor suplementado con el polímero.

La respuesta dinámica de los reactores a la reanudación de la alimentación del agua residual evidenció una rápida recuperación de la actividad metanogénica después de los periodos de 8 horas sin alimentación de sustrato orgánico. Los periodos de interrupción más extensos, de 56 horas, afectaron en mayor medida a la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios, con una mayor concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente y menores rendimientos de metano durante al menos las primeras 8 horas de cada ciclo de operación.

En los tres sistemas se produjo un balance dinámico entre el deterioro y el lavado de gránulos, y la agregación de las partículas de menor tamaño, manteniéndose así un porcentaje de gránulos en el intervalo del 57 al 84 % en el fango de los tres reactores durante la operación intermitente operando a altas cargas orgánicas volumétricas. No obstante, los sistemas se mostraron susceptibles a la flotación y a la pérdida de la integridad estructural de los gránulos con un tamaño superior a 650 μm, poniendo de manifiesto el efecto adverso del patrón intermitente de alimentación y/o del incremento en la carga orgánica volumétrica.

La estructura de las comunidades de bacterias del fango de los tres reactores mostró una sucesión hacia la predominancia de bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* capaces de ejercer un metabolismo sintrófico. Otros filos predominantes en cada inóculo, como *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, redujeron su abundancia relativa, aunque su prevalencia al final del experimento sugirió su participación en la degradación del sustrato orgánico alimentado.

Como en los resultados obtenidos en el capítulo anterior, el género *Methanocorpusculum* fue el más abundante en el dominio Arquea en el fango de los tres reactores, con abundancias relativas en el intervalo del 15.4 al 27.8 %. El predominio de metanógenos hidrogenotróficos indicó que la metanogénesis hidrogenotrófica, con la oxidación sintrófica del sustrato orgánico, representó una ruta importante para la formación de metano en los sistemas estudiados.

**7 FORMACIÓN DE BIOMASA GRANULAR EN
REACTORES ANAEROBIOS ALIMENTADOS
INTERMITENTEMENTE CON UN AGUA
RESIDUAL CONTAMINADA CON DISOLVENTES
ORGÁNICOS**

La efectividad del tratamiento de emisiones atmosféricas de COV procedentes del uso de disolventes orgánicos, mediante la aplicación de la tecnología de biolavador anaerobio, ha sido demostrada en los trabajos realizados por el grupo de investigación GI²AM en colaboración con la compañía Pure Air Solutions B.V. (Bravo, 2017; Vermorel, 2017). En estas investigaciones se destaca la aplicación de esta tecnología para el tratamiento de mayores cargas de COV de elevada solubilidad en comparación con los procesos de tratamiento convencionales, con un requerimiento de superficie menor, y con el valor añadido de la generación de biogás para su uso como fuente de energía en la industria emisora.

Hasta ahora, la investigación en cuanto a la aplicación del biolavador anaerobio se ha enfocado en el tratamiento de disolventes orgánicos de elevada solubilidad en agua, empleando para ello reactores de alta carga inoculados con fangos granulares (Bravo et al., 2017; Ferrero et al., 2018; Lafita et al., 2015; Vermorel et al., 2017). No obstante, un fango en suspensión constituye un inóculo de más fácil adquisición que un fango granular y, como se ha mostrado en el Capítulo 5 de la presente tesis doctoral, es posible obtener un fango granular anaerobio con buenas características fisicoquímicas a partir de la alimentación continua de aguas residuales contaminadas con disolventes orgánicos. En la práctica, las emisiones atmosféricas de COV procedentes del uso de disolventes orgánicos, como las generadas en la industria flexográfica, se producen siguiendo patrones fluctuantes de acuerdo con las interrupciones en los procesos productivos (Bravo et al., 2017; Sempere et al., 2012). Así, la puesta en marcha del sistema de tratamiento está sujeta a variaciones en el suministro del sustrato orgánico. Este hecho podría suponer una dificultad para la obtención de un fango granular que permita el tratamiento de las cargas requeridas garantizando altas eficacias de eliminación de los contaminantes. En el estudio que se presenta a continuación, se aborda la puesta en marcha bajo condiciones de alimentación intermitente de sustrato orgánico de reactores de flujo ascendente inoculados con un fango en suspensión. A la vista del efecto positivo mostrado por la adición de quitosano en el proceso de granulación con alimentación continua de sustrato, los ensayos del presente estudio se realizaron con adición periódica de quitosano a fin de reducir el tiempo requerido para la consecución de biomasa granular.

El estudio se realizó en dos reactores de flujo ascendente, R1 y R2, en condiciones de alimentación intermitente de un agua residual sintética contaminada con los disolventes etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol

(relación másica 7:2:1). El patrón de alimentación se estableció en 16 horas al día durante 7 días a la semana. Ambos reactores se operaron con diferente velocidad ascensional del líquido con el fin de evaluar el efecto de la carga hidráulica sobre el proceso de granulación. La velocidad ascensional del líquido en el reactor R1 varió en el intervalo de 0.05 a 0.15 m h⁻¹ en función de la carga hidráulica aplicada al sistema, mientras que en el reactor R2 este parámetro se ajustó en un valor de 3 m h⁻¹. La puesta en marcha de los dos reactores se llevó a cabo a temperatura ambiente y se evaluó durante un periodo de 106 días dividido en cuatro fases de operación. Al iniciar la primera fase (Fase I), los dos reactores se inocularon con fango en suspensión y se adicionó quitosano en la dosis óptima previamente determinada en un ensayo de jar-test. A continuación, se aplicaron dosis semanales de quitosano hasta la tercera semana del estudio. Durante la primera fase se aplicaron cargas orgánicas bajas para propiciar la adaptación del inóculo al agua residual sintética alimentada. En la segunda fase (Fase II) se incrementó la carga orgánica y se aplicó una dosis única de quitosano. En la siguiente fase (Fase III) se efectuó el aumento de la carga orgánica hasta un valor de 13 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Este valor se estableció a partir de la carga orgánica aplicada durante la operación típica del reactor EGSB de un biolavador anaerobio a escala piloto empleado para el tratamiento de las emisiones atmosféricas de una industria flexográfica: entre 3 y 4 kg DQO h⁻¹ en un volumen efectivo de 8.7 m³ (Bravo, 2017). En la última fase de operación (Fase IV) ambos reactores se operaron en condiciones de alimentación continua de sustrato orgánico con el propósito de evaluar el efecto del cambio del patrón de alimentación sobre el rendimiento. Durante el estudio se realizó el seguimiento de la operación de los reactores y se evaluó la variación temporal de las características del fango anaerobio. Al finalizar el experimento se llevó a cabo el análisis de las poblaciones microbianas del inóculo y del fango obtenido en ambos reactores.

En este capítulo se presenta, además, el estudio comparativo de la estructura microbiana de los reactores analizados en los diferentes experimentos que se han llevado a cabo durante el desarrollo de esta tesis doctoral: Capítulos 5, 6 y 7. Este estudio se ha realizado con el fin de evaluar la respuesta de las comunidades microbianas a las diferentes condiciones de operación fijadas en estos experimentos.

7.1 PLAN DE TRABAJO

En este apartado se detalla el plan de trabajo realizado para el estudio de la formación de biomasa granular durante la puesta en marcha de reactores de flujo ascendente operados en las condiciones anteriormente descritas: alimentación intermitente de un agua residual sintética contaminada con disolventes orgánicos y con adición periódica de quitosano.

7.1.1 Determinación de la dosis óptima de quitosano

La dosis óptima de quitosano se determinó mediante un ensayo de jar-test previo a la inoculación de los sistemas. En el ensayo se evaluaron dosis de quitosano en el intervalo entre 2.0 y 24 mg g SSV⁻¹, seleccionando la dosis óptima a partir de la reducción de la turbidez del sobrenadante y de la disminución del índice volumétrico de fangos.

7.1.2 Puesta en marcha y operación de los reactores

El estudio se llevó a cabo en dos reactores de 7.8 L de volumen efectivo cuya configuración se presenta en la Figura 4.1. El inóculo empleado para la realización de los experimentos fue el fango en suspensión (Inóculo II) procedente del digester anaerobio de la estación depuradora de aguas residuales Quart-Benager. Las características fisicoquímicas de este fango anaerobio se muestran en la Tabla 4.1 del Capítulo 4. El estudio se realizó durante un periodo de 106 días dividido en cuatro fases de operación. En la Tabla 7.1 se presentan las condiciones de operación que se establecieron en cada fase.

En este estudio, la alimentación de sustrato orgánico se realizó durante 16 horas al día y 7 días a la semana, con interrupciones nocturnas de 8 horas simulando turnos de operación que pueden ser habituales en instalaciones industriales. Durante las interrupciones nocturnas se mantuvo el caudal del afluente de los reactores con nutrientes y alcalinidad, y se suspendió la inyección de disolventes orgánicos en la corriente de entrada de los mismos. Los reactores se operaron con velocidades ascensionales del líquido diferentes. El reactor R1 se operó sin corriente de recirculación, con velocidades ascensionales del líquido en el intervalo

comprendido entre 0.05 y 0.15 m h⁻¹ en función de la carga hidráulica. En el reactor R2 se ajustó el caudal de recirculación para mantener la velocidad ascensional del líquido en el lecho de fangos en un valor de 3 m h⁻¹. La corriente de recirculación del líquido se mantuvo durante los periodos sin alimentación de sustrato orgánico.

Tabla 7.1. Condiciones de operación durante la puesta en marcha de los reactores.

Tiempo (días)	Fase I		Fase II		Fase III		Fase IV	
	(0 - 41)		(42 - 69)		(70 - 97)		(98 - 106)	
Reactor	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
PA ¹ (h d ⁻¹)	16		16		16		24	
CO _{16-horas} ²	2.1-4.3	1.4-2.9	6.8-8.0	4.6-8.0	13.0	13.0	10.0	13.0
CO _{24-horas} ³	1.4-2.9	0.9-1.9	5.0-4.6	3.0-5.3	8.7	8.7	10.0	13.0
C _e (g DQO L ⁻¹)	4.3	2.9-2.6	5.4-5.1	3.6-5.1	8.3	8.3	6.4	8.3
TRH (d)	2.00-1.00	2.00-0.92	0.80-0.64	0.80-0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
V _a (m h ⁻¹)	0.05-0.10	3.00	0.12-0.15	3.00	0.15	3.00	0.15	3.00
Temperatura (°C)	23.8 ± 2.1		22.3 ± 2.1		24.0 ± 1.0		23.1 ± 1.8	

¹PA: patrón de alimentación.

²CO_{16-horas} (kg DQO m⁻³ d⁻¹): carga orgánica aplicada durante la operación intermitente de 16 horas al día con alimentación de sustrato orgánico.

³CO_{24-horas} (kg DQO m⁻³ d⁻¹): carga orgánica calculada a 24 horas: 16 horas con y 8 horas sin alimentación de sustrato orgánico.

La estrategia para la puesta en marcha de los reactores y la obtención de biomasa granular consistió en la aplicación de cargas orgánicas crecientes. En la Figura 7.1 se muestran la carga orgánica aplicada en cada fase, la concentración de materia orgánica en la corriente de entrada y el tiempo de retención hidráulico, a fin de ilustrar la variación de los parámetros operacionales durante este estudio. Ambos reactores se pusieron en marcha con una carga orgánica volumétrica baja. En el reactor R1 la carga orgánica inicial fue de 2.1 kg m⁻³ d⁻¹, mientras que en el reactor R2 se aplicó una carga orgánica volumétrica menor, de 1.4 kg m⁻³ d⁻¹, para evitar el lavado excesivo de biomasa como resultado de la mayor velocidad ascensional del líquido en este sistema. No obstante, ambos reactores se operaron con una carga orgánica inicial de 0.67 kg DQO kg SSV⁻¹ d⁻¹, ajustándose para ello la cantidad de fango inoculada. Así, el volumen de fango inoculado en el reactor R1 fue de 2.5 L y el volumen inoculado en el reactor R2 fue de 1.8 L. La máxima carga orgánica volumétrica aplicada al reactor R1 en la primera fase de operación fue de 4.3 kg DQO kg m⁻³ d⁻¹; mientras que en el reactor R2 fue de 2.9 kg DQO kg m⁻³ d⁻¹. Durante la primera fase (Fase I, días 0-41) se añadieron un total de cuatro dosis de

quitosano con periodicidad semanal entre los días 0 y 21. Al iniciar la siguiente fase (Fase II, días 42-69), se añadió una dosis de quitosano a ambos reactores en el primer día de operación y se incrementó la carga orgánica progresivamente hasta un valor de $8 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a la formación de biomasa granular, no se añadieron más dosis del polímero durante el estudio. Así, en la tercera fase de operación (Fase III, días 70-97), sólo se efectuó el incremento de la carga orgánica hasta un valor de $13 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

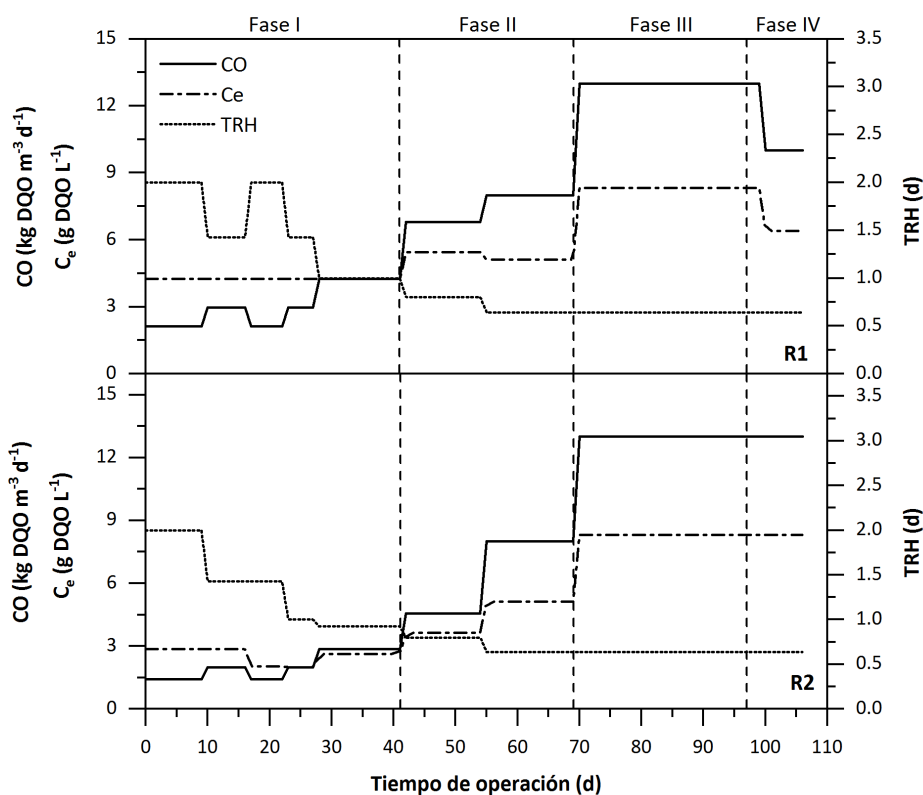


Figura 7.1. Variación temporal de la carga orgánica volumétrica, de la concentración de materia orgánica en la corriente de entrada de los reactores y del tiempo de retención hidráulico.

En las Fases I, II y III se mantuvo el patrón de alimentación intermitente de sustrato orgánico de 16 horas al día y 7 días a la semana. En la Fase IV la alimentación del sustrato orgánico se realizó de manera continua, a fin de evaluar la respuesta de los dos reactores al cambio en el patrón de alimentación, con una carga orgánica

constante de $13 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. El incremento de la carga orgánica durante las Fases I a III se efectuó al alcanzar eficacias de eliminación superiores al 80 % con variaciones de menos del 5 % entre mediciones diarias. Durante la realización del experimento la concentración de disolventes orgánicos en la corriente de entrada de los reactores varió entre 2.0 y 8.3 g DQO L⁻¹, y se aplicaron tiempos de retención hidráulicos en el intervalo entre 2.0 y 0.64 días.

El seguimiento de la operación de los sistemas y la evaluación de su rendimiento durante el transcurso del estudio se llevó a cabo mediante la determinación de los parámetros recogidos en la Tabla 7.2. Durante las Fases I, II y III, en las que el suministro de disolventes orgánicos se realizó de manera intermitente, las muestras objeto de análisis se tomaron después de 6-8 horas desde la reanudación del suministro de sustrato. La composición del biogás producido en cada reactor se evaluó 5 veces a lo largo de los 106 días de duración del experimento. Por otra parte, con el propósito de evaluar la respuesta transitoria de los reactores a la reanudación del suministro de disolventes, se determinaron los siguientes parámetros: concentración de ácidos grasos volátiles, concentración de materia orgánica, concentración de disolventes y concentración de metano disuelto en el efluente de los reactores, en muestras tomadas cada 2 horas durante un periodo total de 8 horas. El seguimiento de la respuesta transitoria se efectuó en el día 94. En este mismo día se determinó la producción acumulada de metano durante un ciclo de operación (16 horas con suministro de sustrato orgánico y 8 horas sin suministro)

Tabla 7.2. Parámetros evaluados durante la puesta en marcha de los reactores y frecuencia de determinación.

Parámetro	Frecuencia de determinación
pH	Al menos 3 veces por semana
Temperatura	Al menos 3 veces por semana
Conductividad	Al menos 3 veces por semana
Alcalinidad	Al menos 3 veces por semana
Concentración de ácidos grasos volátiles	Al menos 3 veces por semana
Concentración de materia orgánica (DQO)	Al menos 2 veces por semana
Concentración de disolventes orgánicos	Al menos 2 veces por semana
Concentración sólidos en el efluente	Al menos 2 veces por semana
Caudal de metano	Al menos 2 veces por semana

7.1.3 Evaluación de la variación de las características fisicoquímicas del fango granular.

La formación de biomasa granular se evaluó de acuerdo con la variación temporal de las características físicas del fango, como la distribución de tamaño de partícula, la velocidad de sedimentación y la resistencia de los gránulos, y las características bioquímicas como la actividad metanogénica específica y el potencial bioquímico de metano. La distribución de tamaño de partícula se determinó en muestras de fango extraídas del primer puerto de los reactores en los días 0, 20, 41, 61, 82 y 106. Al finalizar el estudio, en el día 106, se tomaron muestras de fango de cada reactor para determinar la velocidad de sedimentación, la resistencia de los gránulos, la actividad metanogénica específica, el potencial bioquímico de metano, y para evaluar la morfología de los gránulos.

7.1.4 Análisis de las comunidades microbianas

El análisis de las comunidades microbianas se llevó a cabo mediante secuenciación de alto rendimiento. Las muestras objeto de estudio corresponden al inóculo y a aquéllas obtenidas de ambos reactores al finalizar los ensayos en el día 106.

7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2.1 Determinación de la dosis óptima de quitosano

En la Figura 7.2 se muestra la eficacia de eliminación de la turbidez y el índice volumétrico de fangos en función de las diferentes dosis de quitosano añadidas en el ensayo de jar-test. Para una dosis de $4.1 \text{ mg g SSV}^{-1}$ la eficacia de eliminación de la turbidez fue del 54 %, y aumentó hasta el 85 % con una dosis de $8.1 \text{ mg g SSV}^{-1}$. La adición de dosis mayores no evidenció una reducción significativa de la turbidez, siendo la eficacia de eliminación del 89 % con la dosis máxima de $24.3 \text{ mg g SSV}^{-1}$. En cuanto al índice volumétrico de fangos, éste disminuyó desde un valor inicial de $112.6 \text{ mL g SST}^{-1}$ hasta un valor de $83.3 \text{ mL g SST}^{-1}$ con una dosis de $8.1 \text{ mg g SSV}^{-1}$. Para una dosis dos veces mayor, de $16.2 \text{ mg g SSV}^{-1}$, el índice volumétrico de fangos

fue de $70.9 \text{ mL g SST}^{-1}$, suponiendo una reducción solamente del 15 % respecto a la dosis de $8.1 \text{ mg g SSV}^{-1}$. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la dosis de $8.1 \text{ mg g SSV}^{-1}$ como la dosis óptima de quitosano para obtener la floculación del fango en suspensión (Inóculo II). Este resultado es similar al obtenido por Lafita et al. (2017), quienes obtuvieron una dosis de quitosano de $8.0 \text{ mg g SST}^{-1}$ para la floculación de un fango parcialmente desintegrado. La dosis óptima de quitosano que se obtuvo en el estudio actual fue superior a la obtenida en el estudio expuesto en el Capítulo 5, en el que se utilizó el Inóculo I. Aunque los dos inóculos evaluados procedían del digester anaerobio de la estación depuradora de aguas residuales Quart-Benager, el Inóculo II, empleado en el estudio actual, fue tomado con una diferencia temporal de 19 meses respecto al Inóculo I, presentando características diferentes. El inóculo II presentó una mayor actividad metanogénica específica, una menor concentración de sólidos en suspensión, una menor alcalinidad y una menor conductividad (Tabla 4.1).

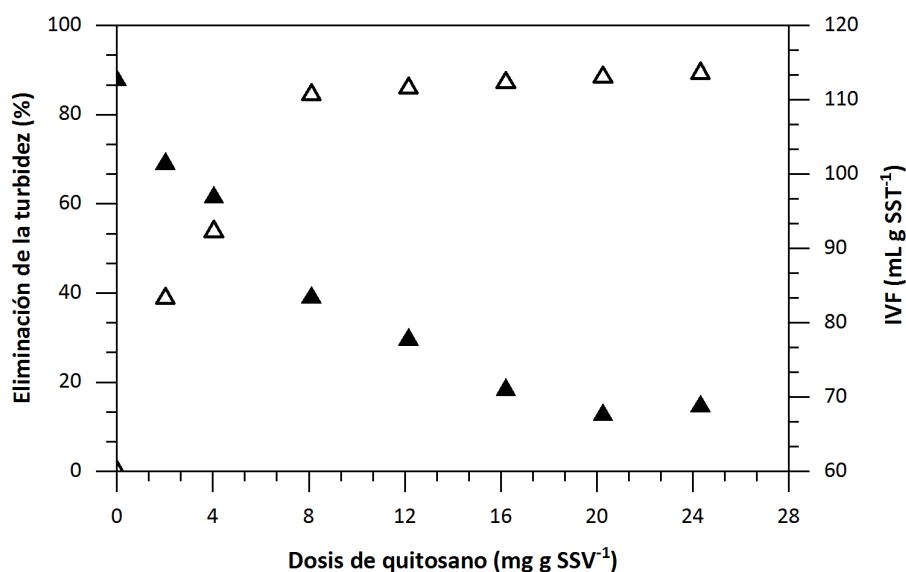


Figura 7.2. Eficacia de eliminación de la turbidez (Δ) e índice volumétrico de fangos (IVF) (▲) para las dosis de quitosano aplicadas en el ensayo de jar-test.

La efectividad del quitosano como floculante depende, tanto de las características del polímero, como de las características del medio, entre éstas el pH y la fuerza iónica. El-Mamouni et al. (1998) encontraron que la eficacia del quitosano para la reducción de la turbidez de un fango desintegrado se redujo drásticamente

para pH superiores a 7.0. Roussy et al. (2004) estudiaron la eficacia del quitosano para la floculación de minerales coloidales a diferente pH: 5.0, 6.3 y 9.0. Estos autores encontraron que a pH de 5.0 y de 6.3, la concentración de quitosano requerida para reducir la turbidez fue inferior a la dosis requerida a pH 9.0. La mayor eficacia del quitosano a pH bajos se debe a que en estas condiciones, la agregación tiene lugar de acuerdo con varios mecanismos: la formación de puentes o el atrapamiento de partículas en la red polimérica, y la neutralización de cargas. Sin embargo, a pH altos, sólo el primer mecanismo es posible, ya que la mayoría de los grupos amino que forman parte de la estructura del quitosano se encuentran desprotonados. Consecuentemente, la densidad de carga del polímero es menor y el proceso de coagulación mediante la neutralización de cargas no se efectúa (Roussy et al., 2004; Yang et al., 2016). Para el inóculo II, el pH fue de 7.69, prácticamente igual al del Inóculo I, 7.64, indicando que la mayor dosis de quitosano requerida se vio influenciada por otros factores diferentes al pH del fango. Entre ellos, la menor fuerza iónica del Inóculo II en comparación con el Inóculo I, atendiendo a la menor conductividad, 7.7 y 9.4 mS cm⁻¹, respectivamente, podría explicar la mayor dosis de quitosano necesaria para conseguir la floculación. La repulsión electrostática entre las dobles capas eléctricas que rodean a las células aumenta a fuerzas iónicas bajas del medio, de modo que se requieren mayores cantidades de floculante para favorecer la unión entre partículas mediante el mecanismo de formación de puentes (Strand et al., 2003; Yang et al., 2016).

7.2.2 Operación de los reactores

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en cuanto a la estabilidad y el rendimiento de los reactores durante los 106 días de duración del experimento. Para evaluar la estabilidad de los sistemas se determinaron los parámetros de control del efluente: pH, alcalinidad, conductividad, concentración de ácidos grasos volátiles y contenido de sólidos. El rendimiento de los reactores se determinó mediante la eficacia de eliminación de la materia orgánica, la producción de metano y la eficacia de degradación de los disolventes que componen la mezcla ternaria alimentada. En la Tabla 7.3 se presentan los resultados de la operación de los reactores junto con su desviación estándar. Estos resultados corresponden al promedio de las mediciones realizadas en las muestras tomadas después de 6-8 horas desde la reanudación del suministro de sustrato orgánico.

Tabla 7.3. Resultados experimentales obtenidos en cada fase de operación.

Tiempo (días)	Fase I (0 - 41)	Fase II (42 - 69)	Fase III (70 - 97)	Fase IV (98 - 106)
	R1			
CO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)*	2.1 - 4.3	6.8 - 8.0	13.0	10.0
EE (%)	76 ± 11	89 ± 7	90 ± 3	90 ± 4
CO _{E2P} (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	0.22 - 0.45	0.72 - 0.84	1.4	1.1
EE _{E2P} (%)	74 ± 14	83 ± 3	84 ± 4	73 ± 8
Producción de CH ₄ (L CH ₄ d ⁻¹)	2.5 ± 2.2	8.2 ± 2.8	17.8 ± 3.9	21.2 ± 1.3
Y CH ₄ (Nm ³ CH ₄ kg DQO ⁻¹ _{degradada})	0.155 ± 0.089	0.197 ± 0.019	0.223 ± 0.021	0.313 ± 0.031
pH	7.7 ± 0.3	7.6 ± 0.3	7.5 ± 0.2	7.3 ± 0.4
Conductividad (mS cm ⁻¹)	5.8 ± 0.6	5.3 ± 0.7	6.3 ± 0.6	6.4 ± 0.2
Alcalinidad (g CaCO ₃ L ⁻¹)	2.5 ± 0.5	2.3 ± 0.3	2.6 ± 0.4	2.9 ± 0.4
	R2			
CO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	1.4 - 2.9	4.6 - 8.0	13.0	13.0
EE (%)	74 ± 15	88 ± 12	90 ± 2	91 ± 2
CO _{E2P} (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	0.15 - 0.30	0.48 - 0.84	1.4	1.4
EE _{E2P} (%)	62 ± 12	75 ± 14	83 ± 5	82 ± 4
Producción de CH ₄ (L CH ₄ d ⁻¹)	1.8 ± 1.2	6.0 ± 3.7	16.6 ± 3.6	26.3 ± 2.9
YCH ₄ (Nm ³ CH ₄ kg DQO ⁻¹ _{degradada})	0.150 ± 0.069	0.220 ± 0.023	0.207 ± 0.027	0.301 ± 0.014
pH	7.9 ± 0.2	7.6 ± 0.3	7.6 ± 0.3	7.4 ± 0.1
Conductividad (mS cm ⁻¹)	5.9 ± 0.5	5.2 ± 0.6	6.2 ± 0.4	6.4 ± 0.2
Alcalinidad (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	2.7 ± 0.5	2.4 ± 0.4	2.5 ± 0.6	2.9 ± 0.1

*Corresponde a la carga instantánea aplicada durante los periodos de alimentación de sustrato orgánico.

En ambos sistemas la eficacia de eliminación de la materia orgánica fue más baja durante la Fase I que en las fases posteriores, mostrando la necesidad de un periodo de adaptación de los microorganismos para efectuar la degradación de los disolventes orgánicos alimentados. En las siguientes fases de operación se obtuvieron eficacias de eliminación similares en los dos reactores, con valores en torno al 90 %. El pH de los reactores se mantuvo en valores cercanos a la neutralidad, siendo los valores de la Fase I ligeramente superiores a los obtenidos en las fases siguientes. Este hecho se puede relacionar con la menor carga orgánica alimentada en esta fase, derivando en un menor consumo de la alcalinidad suministrada para el mantenimiento del pH. El aumento de la alcalinidad (y de la conductividad) en el efluente de los reactores en la Fase IV se debe al incremento en el suministro de bicarbonato en la corriente de entrada desde un valor de 4 a 5 g L⁻¹, a fin de prevenir la inestabilidad de los sistemas durante el suministro continuo de sustrato orgánico. Un resultado a destacar es el bajo rendimiento de metano obtenido durante las Fases I, II y III, las tres etapas en las que los reactores operaron con alimentación intermitente de los disolventes orgánicos. En los siguientes apartados se profundiza en la discusión de los resultados obtenidos en cuanto a la eficacia de eliminación de la materia orgánica y la estabilidad, así como a la producción de metano, la degradación de la mezcla de disolventes orgánicos y la retención de biomasa en cada reactor.

Eficacia de degradación de la materia orgánica y estabilidad

En la Figura 7.3 se presenta la variación temporal de la carga orgánica aplicada a cada reactor y de la eficacia de eliminación obtenida en cada fase de operación. En la Figura 7.4 se muestra la variación temporal de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente de los reactores. Los datos que aquí se presentan corresponden a los valores obtenidos 6-8 horas después de la reanudación de la alimentación del sustrato orgánico.

En cuanto a la eficacia de eliminación de la materia orgánica, ésta aumentó de manera progresiva desde un valor inicial del 60 % en el reactor R1 y del 47 % en el reactor R2, hasta alcanzar un valor del 85 % en ambos reactores tras 9 días de operación. Posteriormente, el incremento de la carga orgánica en el día 10 a un valor de 3.0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en el reactor R1 y a 2.0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en el reactor R2, condujo al descenso de la eficacia de eliminación hasta valores entre el 58 y el 64 %. Estas bajas eficacias de eliminación se mantuvieron durante los 6 días siguientes; de

modo que se disminuyó la carga hasta los valores iniciales a fin de evitar la acumulación de la materia orgánica durante los periodos de alimentación, y con ello, problemas operacionales como la acumulación de ácidos grasos volátiles y el deterioro de la actividad metabólica de las comunidades metanogénicas. Después de 7 días de operación bajo las condiciones indicadas, la eficacia de eliminación aumentó de manera progresiva hasta alcanzar un valor del 82 % en el reactor R1 y del 88 % en el reactor R2 en el día 22, previo al siguiente incremento de carga. Al finalizar la Fase I, aplicando una carga orgánica de $4.3 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el reactor R1 y de $2.9 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el reactor R2, se obtuvieron eficacias de eliminación del 94 y del 92 %, respectivamente.

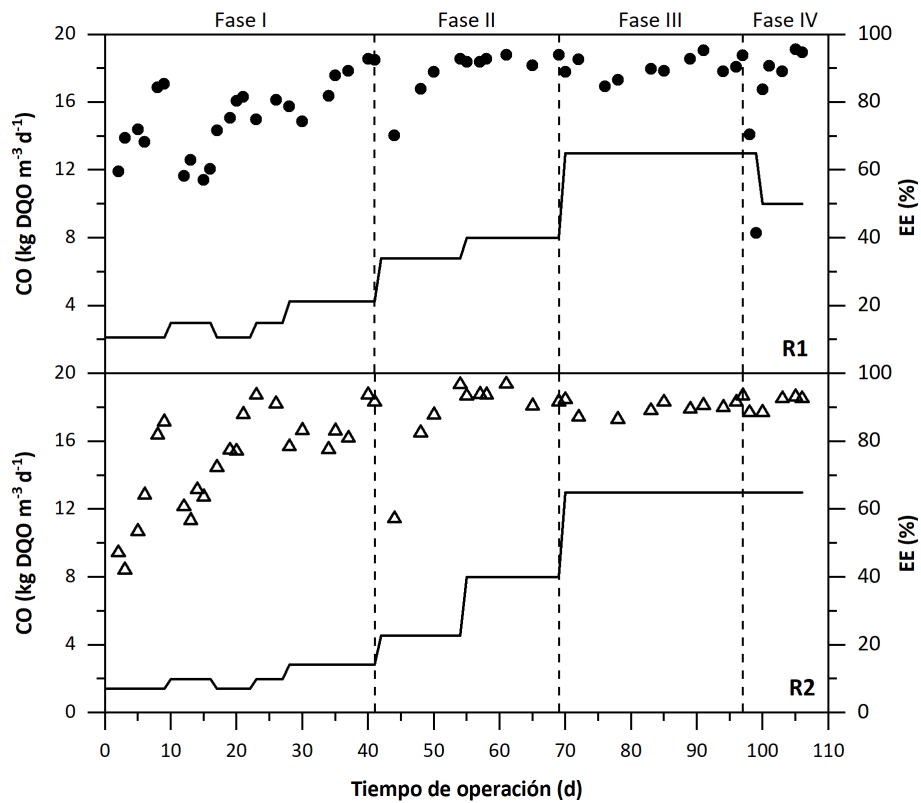


Figura 7.3. Variación temporal de la carga orgánica volumétrica aplicada a cada reactor (—) y de la eficacia de eliminación durante las diferentes fases del estudio (R1●; R2Δ).

La concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente de los reactores (Figura 7.4) durante la Fase I osciló en el intervalo comprendido entre 0 y 1375 mg L⁻¹ en el reactor R1, y entre 0 y 1020 mg L⁻¹ en el reactor R2, en respuesta al aumento en la carga orgánica aplicada. La concentración de ácidos grasos volátiles aumentó con cada incremento de la carga, disminuyendo progresivamente hasta la aplicación del siguiente incremento. En el efluente del reactor R1 la concentración promedio de ácidos grasos volátiles fue de 473 ± 375 mg L⁻¹. En el efluente del reactor R2 se detectaron concentraciones más bajas con un valor promedio de 308 ± 273 mg L⁻¹ debido a la menor carga orgánica aplicada en este sistema. Las altas concentraciones detectadas durante esta fase indicaron cierto desequilibrio entre la producción y la degradación de los ácidos grasos volátiles, el cual está determinado por la menor actividad de los microorganismos metanogénicos. No obstante, al finalizar la Fase I en el día 41, la concentración de ácidos grasos volátiles detectada en el efluente de ambos reactores fue inferior a 100 mg L⁻¹, demostrando una mayor actividad para la degradación de los ácidos grasos volátiles producidos, a pesar del aumento progresivo de la carga orgánica.

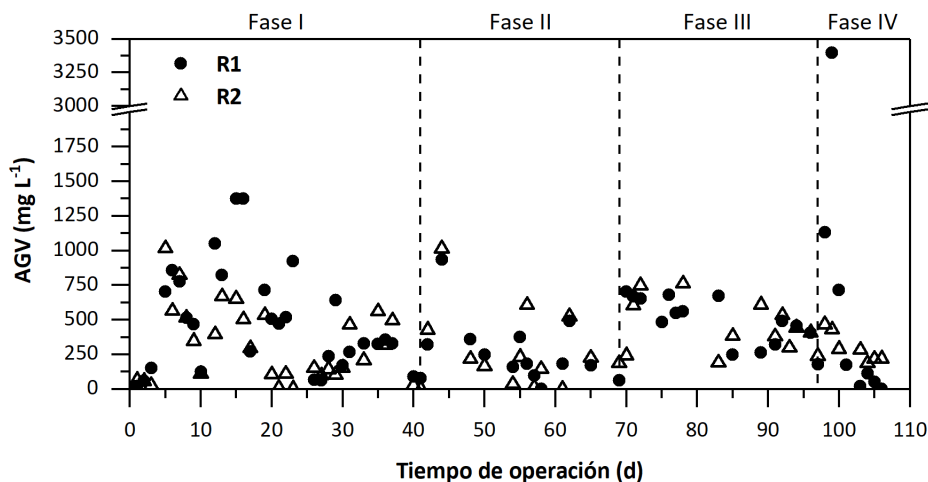


Figura 7.4. Variación temporal de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en el efluente de cada reactor (R1●; R2Δ).

Como se mencionó previamente, durante la Fase I se realizaron cuatro dosificaciones de quitosano en los días 0, 7, 14 y 21, con el fin de acelerar el proceso de granulación y, por tanto, la puesta en marcha de los reactores. Sin embargo, después de la adición del día 21, se observó la adhesión de las burbujas de biogás a

la biomasa, causando el ascenso de parte del fango anaerobio hacia la zona superior de los reactores. Una fracción de la biomasa que ascendió retornó al lecho de los reactores con el desprendimiento del gas en el separador GLS. No obstante, una fracción considerable ingresó junto con el biogás en la zona de sedimentación, siendo necesaria la apertura de los reactores para promover la desgasificación y el retorno de la biomasa hacia el lecho. Durante este episodio también se observó el lavado de biomasa. Por lo tanto, se suspendió la dosificación semanal de quitosano y los reactores operaron sin la adición del polímero hasta finalizar la Fase I. En el apartado 7.2.4 correspondiente a la formación de biomasa granular se aborda con mayor detalle la influencia del quitosano en la adhesión de las burbujas de biogás a la biomasa y la incidencia de este fenómeno en la puesta en marcha de los reactores.

La Fase II se inició en el día 42 con el incremento de la carga orgánica hasta un valor de $6.8 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el reactor R1 y de $4.6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el reactor R2. Además, en vista de los resultados obtenidos en cuanto a la formación de biomasa granular, se aplicó una dosis única de quitosano. El incremento de la carga orgánica resultó en una disminución de la eficacia de eliminación en ambos sistemas junto con un aumento de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente. Para el reactor R1, la concentración de ácidos grasos en el efluente aumentó hasta un valor de 935 mg L^{-1} , con la disminución concomitante de la eficacia de eliminación hasta un valor del 70 %. De manera similar, la concentración de ácidos grasos volátiles en el reactor R2 aumentó hasta 1013 mg L^{-1} , con el consecuente descenso de la eficacia de eliminación hasta un valor del 57 %. Posteriormente, la eficacia de eliminación aumentó de manera progresiva junto con la disminución de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente de los dos reactores y, pese al incremento de la carga orgánica que se efectuó en el día 55, las eficacias de eliminación se mantuvieron en valores superiores al 90 % hasta el final de la Fase II. Al finalizar esta fase en el día 69, la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente de los reactores R1 y R2 fue de 60 mg L^{-1} y 186 mg L^{-1} , respectivamente. Durante las dos primeras fases de operación se corroboró que, pese a la mayor velocidad ascensional del líquido en el reactor R2, la pérdida de sólidos fue baja y comparable con la del reactor R1. Por ello, a partir del día 55 se aumentó la carga en el reactor R2 y ambos reactores se operaron a la misma carga orgánica. Bravo (2017) estudió la eficacia de operación a largo plazo de un reactor EGSB a escala piloto inoculado con fango granular para el tratamiento intermitente de una corriente contaminada con etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, principalmente. Con una carga orgánica promedio de $2.45 \pm 1.19 \text{ kg DQO h}^{-1}$

(correspondiente a 6.76 ± 3.28 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ para un volumen efectivo del reactor de 8.7 m^3), este autor reportó una eficacia de eliminación del 92 ± 4 %. Los resultados obtenidos durante la Fase II del presente estudio, en el que se alcanzaron eficacias superiores al 90 % aplicando una carga de $8 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$, ponen de manifiesto que en un periodo inferior a 2 meses fue posible alcanzar eficacias similares a las obtenidas por Bravo (2017) utilizando un fango en suspensión como inóculo, posibilitando así la disminución del coste asociado a la adquisición de un fango granular.

En la siguiente fase, Fase III, se aumentó la carga orgánica en los dos reactores hasta $13 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$. Inicialmente se observó la disminución de la eficacia de eliminación de la materia orgánica hasta un valor del 85 % y, tras 13 días operando con la carga indicada —suministrada de manera intermitente—, se alcanzaron eficacias de eliminación superiores al 90 %. En esta fase los dos reactores presentaron concentraciones de ácidos grasos volátiles similares en el efluente, con un valor promedio de $489 \pm 175 \text{ mg L}^{-1}$ en el reactor R1 y de $479 \pm 212 \text{ mg L}^{-1}$ en el reactor R2. De este modo, operando a una misma carga orgánica, el rendimiento de ambos sistemas fue similar, lo cual indica que la mayor velocidad de recirculación en el reactor R2 no propició la obtención de mejores resultados. Jeison y Chamy (1999) tampoco apreciaron diferencias significativas al comparar el rendimiento de un reactor UASB y de un reactor EGSB operando con diferentes velocidades ascensionales del líquido durante el tratamiento en continuo de una corriente contaminada con 10 g DQO L^{-1} de etanol. Estos autores aplicaron velocidades ascensionales entre 0.3 y 1.1 m h^{-1} en el reactor UASB, y entre 3.8 y 10 m h^{-1} en el reactor EGSB. La similitud en el rendimiento de los sistemas estuvo asociada a una alta producción de biogás en el reactor UASB que produjo la agitación en el lecho de reacción, mejorando así el contacto entre la biomasa y el agua residual y la eficacia de degradación, incluso al operar con bajas velocidades ascensionales. En contraste, en otros estudios se ha observado que la mayor velocidad ascensional del líquido en los reactores EGSB y, por tanto, el mejor contacto entre el agua residual y la biomasa activa, conlleva un mayor rendimiento, así como a la posibilidad de aplicar cargas más elevadas respecto a los reactores UASB. Los reactores EGSB han demostrado ser más eficaces para el tratamiento de aguas residuales que contienen compuestos tóxicos pero biodegradables en condiciones anaerobias (Puyol et al., 2009; Zoutberg y De Been, 1997), de aguas residuales en condiciones psicrófilas (Lettinga et al., 2001; Scully et al., 2006; Tsushima et al.,

2010) y de aguas residuales con una baja concentración de contaminantes (Kato et al., 1994).

Los resultados obtenidos en las tres fases en las que los reactores operaron con alimentación intermitente de disolventes orgánicos (Fase I, Fase II y Fase III), con un patrón de 16 h al día durante 7 días a la semana, evidenciaron un rendimiento satisfactorio de los sistemas en cuanto a la eficacia de eliminación de la materia orgánica, alcanzando valores superiores al 90 % operando a las cargas orgánicas aplicadas. Los resultados demostraron, además, la capacidad de los sistemas para alcanzar un estado pseudo-estacionario bajo los ciclos de operación aplicados, demostrando a su vez la adaptabilidad de los microorganismos a los periodos sin suministro de sustrato orgánico y la recuperación de su actividad cuando la reanudación del mismo tuvo lugar. La carga orgánica aplicada durante la puesta en marcha de los reactores se encuentra dentro del intervalo recomendado en la bibliografía para la aplicación práctica de sistemas de tipo UASB, comprendido entre 4 y 15 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ (Rittmann y McCarty, 2001). No obstante, aunque se obtuvieron altas eficacias de eliminación durante las etapas con alimentación intermitente de sustrato orgánico, la concentración de ácidos grasos volátiles se mantuvo en valores relativamente altos, indicando un cierto desequilibrio entre las cinéticas de producción y de consumo de los ácidos grasos volátiles por parte de los microorganismos acetogénicos y metanogénicos, respectivamente. La adición de bicarbonato de sodio en la corriente de entrada permitió mantener el pH en niveles adecuados para el crecimiento de las diferentes comunidades de microorganismos que llevan a cabo la degradación anaerobia del sustrato orgánico.

Con el fin de evaluar la respuesta de los reactores al suministro continuo de disolventes orgánicos, en la Fase IV, que se inició en el día 98, el patrón de alimentación de disolventes se modificó de 16 a 24 horas al día durante 7 días a la semana. En condiciones de suministro continuo de una carga orgánica de 13 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ se produjo la sobrecarga del reactor R1. La eficacia de eliminación de este reactor descendió hasta un valor del 70 % en el día 98 y del 41 % en el día 99 (Figura 7.3), con el aumento en la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente del reactor hasta un valor de 3400 mg L^{-1} (Figura 7.4). A continuación, la carga orgánica se redujo hasta un valor de 10 kg DQO $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$, obteniéndose eficacias de eliminación del 95 % y concentraciones de ácidos grasos inferiores a 100 mg L^{-1} , recuperando la estabilidad del proceso. En contraste, en el reactor R2 se obtuvieron eficacias de eliminación superiores al 93 % operando con la alimentación continua

de $13 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, con concentraciones de ácidos grasos volátiles en el efluente que disminuyeron de manera progresiva desde un valor de 470 mg L^{-1} hasta un valor de 220 mg L^{-1} al finalizar el estudio. El mejor comportamiento del reactor R2 al modificar el patrón de alimentación puede atribuirse a la dilución en el lecho de reacción derivada de la aplicación de la corriente de recirculación, que permitió amortiguar el efecto adverso del incremento de la carga orgánica diaria. Además, la corriente de recirculación, y por tanto la mayor velocidad ascensional, pudo haber mejorado el contacto entre la biomasa y el agua residual sintética al inicio de esta fase, propiciando la mayor velocidad de degradación del sustrato orgánico.

Producción de metano

En la Figura 7.5 se presenta la variación temporal de la producción de metano en cada reactor junto con la carga orgánica aplicada y el rendimiento de metano obtenido en las diferentes fases del estudio.

Durante las primeras dos semanas del estudio se observaron bajas producciones de metano en los dos reactores debido a las bajas cargas orgánicas aplicadas, a las bajas eficacias de eliminación obtenidas y al desequilibrio entre las etapas acidogénica y metanogénica del proceso de degradación, tal como indican las altas concentraciones de ácidos grasos volátiles en el efluente de los reactores (Figura 7.4). No obstante, con la adaptación al sustrato y con el incremento de la carga orgánica volumétrica, la producción de metano aumentó, mostrando valores estables al finalizar cada fase de operación. La producción de metano al finalizar la Fase III, operando con una carga orgánica intermitente de $13 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, fue de 23.0 L d^{-1} en el reactor R1, y de 22.7 L d^{-1} en el reactor R2. En la Fase IV, con el cambio en el patrón de alimentación se observó el descenso de la producción de metano en el reactor R1 hasta 15 L d^{-1} , aunque posteriormente tras la reducción de la carga, aumentó hasta un valor de $21.2 \pm 1.3 \text{ L d}^{-1}$. Esta producción fue similar a la obtenida en la Fase III, pese a que la carga orgánica aplicada fue menor. Del mismo modo, la producción de metano en el reactor R2 aumentó aproximadamente 8 L d^{-1} en la Fase IV respecto a la producción obtenida en la Fase III. Estos resultados muestran que la producción de metano se vio afectada bajo condiciones de alimentación intermitente del sustrato orgánico. Así, entre los días 20 y 97, los rendimientos de metano obtenidos fueron bajos respecto al valor estequiométrico de $0.350 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$, concretamente, en el intervalo entre 0.189 y $0.242 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el reactor R1 y entre 0.180 y $0.233 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$

en el reactor R2. En contraste, durante la Fase IV se obtuvieron rendimientos más próximos al valor estequiométrico, $0.313 \pm 0.031 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el reactor R1 y $0.304 \pm 0.014 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el reactor R2. La menor producción de metano con alimentación intermitente de sustrato ya fue observada en los ensayos con fango granular presentados en el Capítulo 6 de esta tesis y en el trabajo de Lafita (2016), quien obtuvo un rendimiento de metano promedio de $0.173 \pm 0.063 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el tratamiento intermitente de un agua residual que contenía etanol y 1-metoxi-2-propanol en un reactor EGSB.

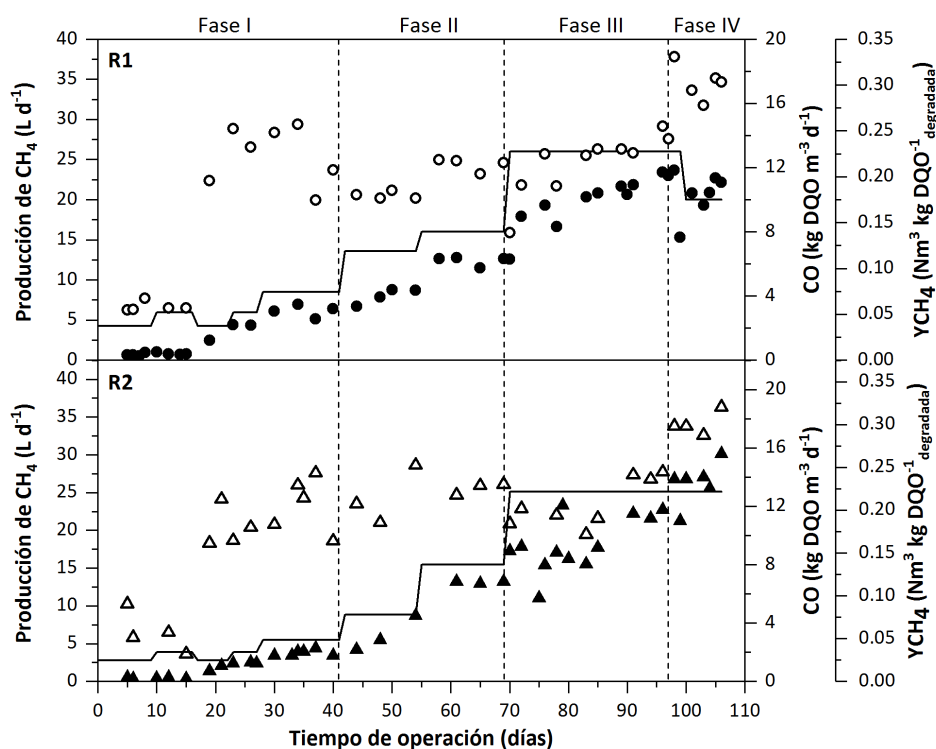


Figura 7.5. Producción de metano (R1●; R2▲), carga orgánica aplicada (—) y rendimiento de metano (R1○; R2△) en cada reactor durante las diferentes fases del estudio.

Dado que el tiempo de retención hidráulico de los reactores en las fases con alimentación intermitente fue similar (15.4 horas en las Fases II y III) al tiempo total de alimentación de sustrato orgánico (16 horas), es posible que los sistemas estuvieran operando en estado transitorio al llevarse a cabo la toma de muestras,

no habiéndose recuperado el potencial máximo de producción de metano durante la operación intermitente. Este hecho podría explicar la diferencia entre los rendimientos observados en las Fases I, II y III y el mayor rendimiento en la Fase IV. Con el fin de profundizar en la dinámica de la producción de metano, en el apartado 7.2.3 se discute en mayor detalle la respuesta transitoria de los reactores a la reanudación de la alimentación de los disolventes orgánicos.

El biogás producido en los reactores presentó una composición promedio de metano de 72.2 ± 2.0 % en el reactor R1 y de 72.4 ± 1.1 % en el reactor R2.

Eficacia de degradación de los disolventes orgánicos

Durante la realización del estudio se evaluó la composición del efluente de los reactores para determinar la eficacia de eliminación de cada uno de los disolventes orgánicos. Tal como se había observado en los experimentos anteriores, las eficacias de eliminación del etanol y del acetato de etilo en ambos reactores fueron superiores al 99 % desde el comienzo del experimento, mostrando la capacidad del inóculo para efectuar la degradación de los mismos sin requerir una etapa de adaptación previa, mientras que se detectó 1-etoxi-2-propanol en el efluente de los dos reactores a lo largo del experimento. En la Figura 7.6 se muestra la carga orgánica de 1-etoxi-2-propanol aplicada, su eficacia de eliminación y su concentración en el efluente de cada reactor durante el estudio.

La eficacia de eliminación inicial del 1-etoxi-2-propanol presentó valores del 40 % para el reactor R1 y del 36 % para el reactor R2 tras 3 días de operación. No obstante, ambos sistemas demostraron una adaptación rápida a la degradación de este disolvente orgánico y, en el día 8, las eficacias de eliminación alcanzadas fueron del 84 % en el reactor R1 y del 69 % en el reactor R2. Esta rápida adaptación coincide con la observada en los resultados presentados en el Capítulo 5, en el que se demostró que una única adición de quitosano durante la inoculación de reactores anaerobios disminuyó el periodo de adaptación requerido por un fango en suspensión para metabolizar el 1-etoxi-2-propanol. Posteriormente, el incremento de la carga orgánica en los dos reactores conllevó el aumento inicial de la concentración en el efluente del reactor con la consecuente disminución de la eficacia de eliminación. Sin embargo, ambos parámetros se mostraron relativamente estables durante las tres fases de operación con alimentación intermitente de sustrato orgánico (Tabla 7.3). La eficacia de eliminación promedio

en el reactor R1 fue del $82 \pm 4 \%$ entre los días 8 y 97, con una concentración promedio en el efluente de $110 \pm 35 \text{ mg DQO L}^{-1}$. En el reactor R2, entre los días 8 y 54, operando a cargas orgánicas menores que el reactor R1, se obtuvo una eficacia de eliminación promedio de $67 \pm 9 \%$, correspondiente a una concentración en el efluente de $97 \pm 38 \text{ mg DQO L}^{-1}$, indicando la menor capacidad de eliminación de este reactor. A partir del día 55, operando ambos reactores a la misma carga orgánica, se obtuvieron eficacias de eliminación similares, con un valor promedio del $84 \pm 4 \%$ y una concentración de $129 \pm 49 \text{ mg DQO L}^{-1}$.

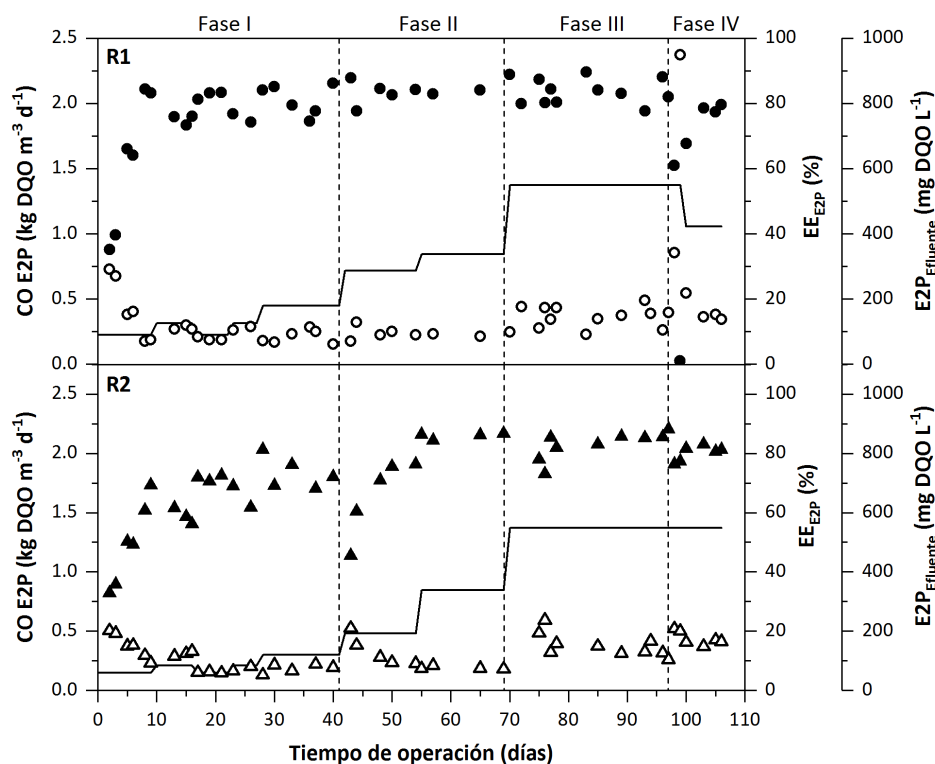


Figura 7.6. Carga orgánica de 1-etoxi-2-propanol (E2P) aplicada durante el estudio (—), eficacia de eliminación (R1●; R2▲) y concentración en el efluente de cada reactor (R1○; R2△).

En la Figura 7.6 se puede observar, además, que el cambio en el patrón de alimentación al iniciar la Fase IV produjo la acumulación de 1-etoxi-2-propanol en el reactor R1, con un aumento de la concentración en el efluente de hasta $950 \text{ mg DQO L}^{-1}$, reduciéndose la eficacia de eliminación de este compuesto hasta

un valor próximo al 0 %. No obstante, la estabilidad del reactor se recuperó con la reducción de la carga orgánica, alcanzando una eficacia de eliminación 1-etoxi-2-propanol del 80 % al finalizar el estudio. En el reactor R2 se observó un ligero aumento en la concentración de 1-etoxi-2-propanol en el efluente con el respectivo descenso de la eficacia de eliminación hasta el 76 %, para posteriormente aumentar hasta un valor del 81 % hasta finalizar el estudio. Los productos intermediarios asociados a la ruta de degradación anaerobia del 1-etoxi-2-propanol, acetona e isopropanol, también se detectaron en el efluente de los reactores durante este experimento. En el reactor R1 se detectaron concentraciones promedio de acetona e isopropanol de 26 ± 20 mg DQO L⁻¹ y 18 ± 16 mg DQO L⁻¹, respectivamente, excepto en el día 99, en el que con la sobrecarga del reactor las concentraciones de estos compuestos ascendieron hasta 140 y 181 mg L⁻¹. En el reactor R2 se detectaron concentraciones promedio de acetona e isopropanol de 20 ± 16 mg DQO L⁻¹ y 16 ± 21 mg DQO L⁻¹, respectivamente.

Retención de sólidos

En la Figura 7.7 se muestra la concentración de sólidos suspendidos en el efluente de los reactores en cada fase de operación. Durante los primeros 30 días de la Fase I la concentración de sólidos suspendidos osciló entre valores de 71 a 300 mg L⁻¹ en el efluente del reactor R1 y entre 44 y 518 mg L⁻¹ en el efluente del reactor R2. Posteriormente, en el efluente de ambos reactores se detectaron concentraciones de sólidos suspendidos en el intervalo comprendido entre 30 y 120 mg L⁻¹, excepto en el día 99, en el cual en el efluente del reactor R2 la concentración ascendió hasta 220 mg L⁻¹ como consecuencia de la sobrecarga del sistema. La menor concentración de sólidos en el efluente de los reactores a partir del día 30 indica el aumento del tiempo de retención de sólidos, hecho que puede relacionarse con la formación de biomasa granular (Bhunia y Ghangrekar, 2007).

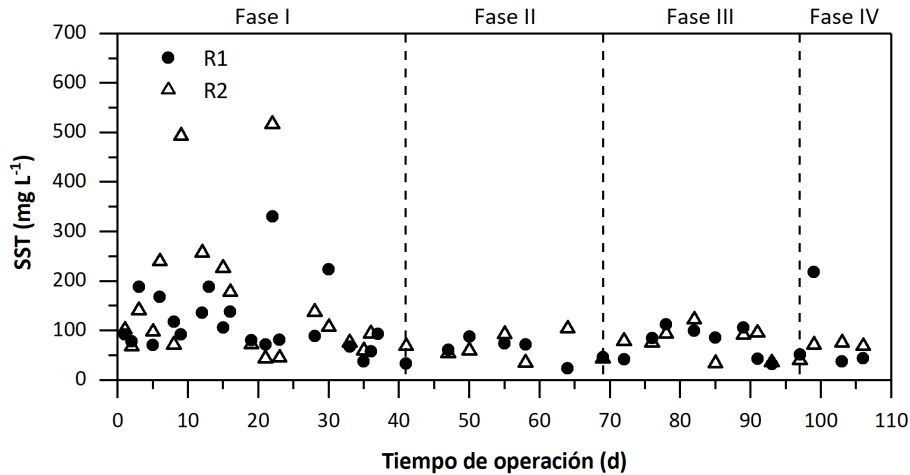


Figura 7.7. Variación temporal de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) en el efluente de cada reactor en cada fase operacional.

El tiempo de retención de sólidos se determinó en los días 44 y 82 del experimento de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{TRS} = \frac{\text{SST}_{\text{reactor}}}{\text{SST}_{\text{eliminados}}} = \frac{\text{SST}_{\text{reactor}}}{\text{SST}_{\text{efluente}} + \text{SST}_{\text{removidos}}} \quad (7.1)$$

donde, $\text{SST}_{\text{reactor}}$ corresponde a la cantidad de sólidos dentro del reactor (g); $\text{SST}_{\text{eliminados}}$ a la cantidad de sólidos lavados del sistema (g d^{-1}); $\text{SST}_{\text{efluente}}$ es la cantidad de sólidos lavados en el efluente del reactor (g d^{-1}) y $\text{SST}_{\text{removidos}}$ es la cantidad de sólidos extraídos del reactor a partir de la realización de purgas o tomas de muestras (g d^{-1}). Puesto que no se realizaron purgas durante el experimento, y que la cantidad de sólidos extraída de los reactores para la toma de muestras fue aproximadamente un 5 % de la cantidad inicial de sólidos suspendidos en cada reactor, el término $\text{SST}_{\text{removidos}}$ se consideró despreciable.

En la Tabla 7.4 se muestra el tiempo de retención estimado. En ambos reactores aumentó en el día 82 respecto a los valores obtenidos en el día 44, atribuyéndose dicho aumento a la formación de agregados. Los tiempos de retención obtenidos, de 66.5 d para el reactor R1 y de 44.2 d para el reactor R2, se encuentran dentro del intervalo reportado en la bibliografía para reactores

anaerobios de lecho granular empleados para el tratamiento de aguas residuales bajo temperaturas mesofílicas, que es de entre 30 y 100 días (Grady et al., 2011; Kundu et al., 2012; Sudmalis et al., 2018).

Tabla 7.4. Tiempo de retención de sólidos en diferentes días del experimento.

Día de operación	día 44		día 82	
	R1	R2	R1	R2
Reactor				
SST _{reactor} (g SST)	54.9	34.0	60.0	43.9
SST _{efluente} (g SST d ⁻¹)	1.1	1.2	0.9	1.0
TRS (d)	50.2	28.1	66.5	44.2

El parámetro SST_{efluente} fue determinado para una muestra integrada de 16 h en los días indicados.

TRS: Tiempo de retención de sólidos.

Los resultados obtenidos muestran una retención satisfactoria de la biomasa. No obstante, durante el estudio se observó la flotación de biomasa, tanto en suspensión como granular, en ambos reactores. Dos son los principales factores que pudieron conllevar la flotación de la biomasa en los reactores. Por un lado, la adhesión de burbujas de biogás a la superficie de las partículas, favorecida por el carácter hidrofóbico de la superficie de los microorganismos metanogénicos. Por otro lado, la limitación de sustrato orgánico (especialmente hacia el interior de los agregados) durante los periodos sin alimentación de disolventes pudo promover la formación de agregados con una menor densidad de microorganismos activos en el núcleo, principalmente debido a la autólisis celular ocasionada por la insuficiencia de sustrato (Schmidt y Ahring, 1996). Estos gránulos huecos son más susceptibles a la flotación y a la erosión causada por las fuerzas de cizalladura dentro de los reactores (Kosaric et al., 1990; Tiwari et al., 2006).

Además del tiempo de retención de sólidos, también se estimó el coeficiente de rendimiento de biomasa-sustrato (Y_{xs}) para ambos reactores. El rendimiento de biomasa, definido como la relación entre la cantidad de biomasa producida y la cantidad de sustrato degradado, es una medida cuantitativa del crecimiento celular en relación con la degradación de un sustrato determinado. Este parámetro se determinó tras la estimación de la biomasa producida y de la materia orgánica degradada entre los días 0 y 82 del estudio. Para el cálculo de la biomasa producida se determinó el incremento de la cantidad de biomasa en el interior de cada reactor en el periodo evaluado, adicionándose a la cantidad de biomasa lavada en el efluente. El sustrato degradado se calculó a partir de la eficacia de eliminación.

En el reactor R1 se obtuvo un rendimiento de biomasa de $0.030 \text{ g DQO}_{\text{biomasa}} \text{ g DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$, mientras que en el reactor R2 el rendimiento fue de $0.034 \text{ g DQO}_{\text{biomasa}} \text{ g DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$. Los valores encontrados en la bibliografía para el coeficiente de rendimiento de biomasa en sistemas de tratamiento anaerobio son variables dependiendo del tipo de sustrato utilizado. Ello se debe, principalmente, al diferente rendimiento de los distintos tipos de microorganismos involucrados en las etapas del proceso de degradación anaerobia. De acuerdo con Grady et al. (2011), el rendimiento de biomasa de los microorganismos que realizan la fermentación de carbohidratos es de $0.10\text{-}0.17 \text{ g DQO}_{\text{biomasa}} \text{ g DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$, y el rendimiento de los microorganismos que realizan la oxidación anaerobia del propionato es de $0.04\text{-}0.05 \text{ g DQO}_{\text{biomasa}} \text{ g DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$. El rendimiento de metanógenos acetoclásticos e hidrogenotróficos es de $0.03\text{-}0.07$ y de $0.01\text{-}0.06 \text{ g DQO}_{\text{biomasa}} \text{ g DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$, respectivamente. Los coeficientes de rendimiento de biomasa obtenidos para ambos reactores en este estudio se asemejan a los valores encontrados en la bibliografía a partir de sustratos acetogénicos y metanogénicos, dado que el sustrato alimentado estaba mayoritariamente constituido por etanol.

7.2.3 Respuesta dinámica ante la reanudación del suministro de disolventes orgánicos

Con el propósito de profundizar en el estudio del efecto del aporte intermitente de sustrato sobre la degradación del agua residual alimentada y sobre el rendimiento de metano, se analizó la respuesta dinámica de los reactores ante la reanudación del suministro de disolventes. Para ello, se determinó la producción de metano en un ciclo de operación y se llevó a cabo la caracterización del efluente cada 2 horas durante un periodo de 8 horas desde el inicio del aporte de sustrato. La respuesta dinámica de los reactores se evaluó en el día 94 del estudio, día en el que la carga orgánica instantánea aplicada fue de $13 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. En la Figura 7.8 se muestra el volumen de metano acumulado recogido durante un ciclo de operación: 16 horas con alimentación y 8 horas sin alimentación de disolventes. En la Figura 7.9 se presentan los resultados de los parámetros analizados en el efluente de los reactores: concentración de materia orgánica, concentración de ácidos grasos volátiles, concentración de disolventes orgánicos y concentración de metano disuelto.

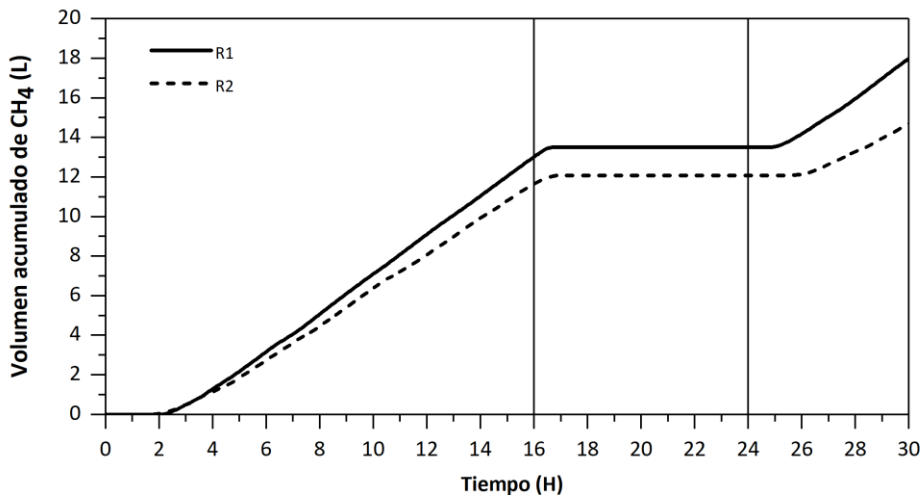


Figura 7.8. Volumen de metano acumulado para cada reactor durante un ciclo de operación: 16 horas de alimentación y 8 horas de interrupción del aporte de disolventes orgánicos.

De acuerdo con la Figura 7.8, la captación de metano en ambos reactores se inició tras aproximadamente 2 horas desde la reanudación del suministro de disolventes orgánicos, y finalizó después de 0.5 horas desde la suspensión del mismo, degradándose rápidamente la materia orgánica remanente, indicando que no se produjo su acumulación. El bajo volumen de metano recogido en los dos reactores en las primeras horas de operación puede estar relacionado con la disolución de parte del metano producido tras las interrupciones nocturnas, además del metano utilizado en el llenado de las líneas que conducen el biogás hasta el dispositivo de medición. No obstante, después de dos horas de operación, las curvas de volumen acumulado muestran una producción constante de $1.0 \text{ L CH}_4 \text{ h}^{-1}$ en el reactor R1 y de $0.90 \text{ L CH}_4 \text{ h}^{-1}$ en el reactor R2, valores que se reprodujeron en el siguiente ciclo de operación. La producción acumulada de metano durante un ciclo de operación fue de 13.5 L en el reactor R1 y de 12.1 L en el reactor R2. Considerando que durante las 16 horas de operación se alimentó una cantidad de materia orgánica de 67.6 g DQO, y que la eficacia de eliminación tras 8 horas de operación fue del 87 % en ambos reactores, el rendimiento de metano resultante es de $0.230 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el reactor R1 y de $0.206 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en el reactor R2, valores considerablemente inferiores en comparación con el valor estequiométrico de $0.350 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$.

La concentración de materia orgánica en el efluente (Figura 7.9a) aumentó en el reactor R1 hasta alcanzar un valor máximo próximo a 1270 mg DQO L⁻¹ tras cuatro horas desde la reanudación de la alimentación, para disminuir hasta un valor de 1080 mg DQO L⁻¹ después de 8 horas de operación. La concentración de ácidos grasos volátiles mostró un patrón similar (Figura 7.9b), alcanzando un valor de 450 mg L⁻¹ después 8 horas de alimentación de disolventes. En el efluente del reactor R2 la concentración de materia orgánica y la concentración de ácidos grasos volátiles aumentaron de manera progresiva con valores algo inferiores a los del reactor R1, aunque tras 8 horas de operación, se alcanzaron valores similares de 1100 mg DQO L⁻¹ y 440 mg L⁻¹, respectivamente. El único componente de la mezcla de disolventes detectado en el efluente de los reactores fue el 1-etoxi-2-propanol (Figura 7.9c). En el reactor R1, de manera similar al incremento de la concentración de materia orgánica y de los ácidos grasos volátiles, se observó el incremento de la concentración de este compuesto desde un valor de 39 mg DQO L⁻¹ hasta un valor de 170 mg DQO L⁻¹ tras 4 horas, para después disminuir hasta 155 mg DQO L⁻¹. En el reactor R2, la concentración aumentó gradualmente hasta un valor de 166 mg DQO L⁻¹ tras 8 horas de operación, sin alcanzar un valor estable durante este periodo. Además del 1-etoxi-2-propanol, se detectaron los compuestos intermediarios de su degradación, acetona e isopropanol, en concentraciones máximas de 58 y 34 mg DQO L⁻¹ en el reactor R1, y de 21 y 13 mg DQO L⁻¹ en el reactor R2, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que, operando con velocidades ascensionales del líquido diferentes, ambos reactores alcanzaron concentraciones de materia orgánica similares tras 8 horas desde la reanudación del suministro de disolventes orgánicos. Este hecho sugiere que en el reactor R1, operando con una velocidad ascensional menor que la del reactor R2, la producción de biogás fue suficiente para promover la agitación de lecho, mejorando así el contacto entre la biomasa y el agua residual y, por tanto, la velocidad de degradación del sustrato.

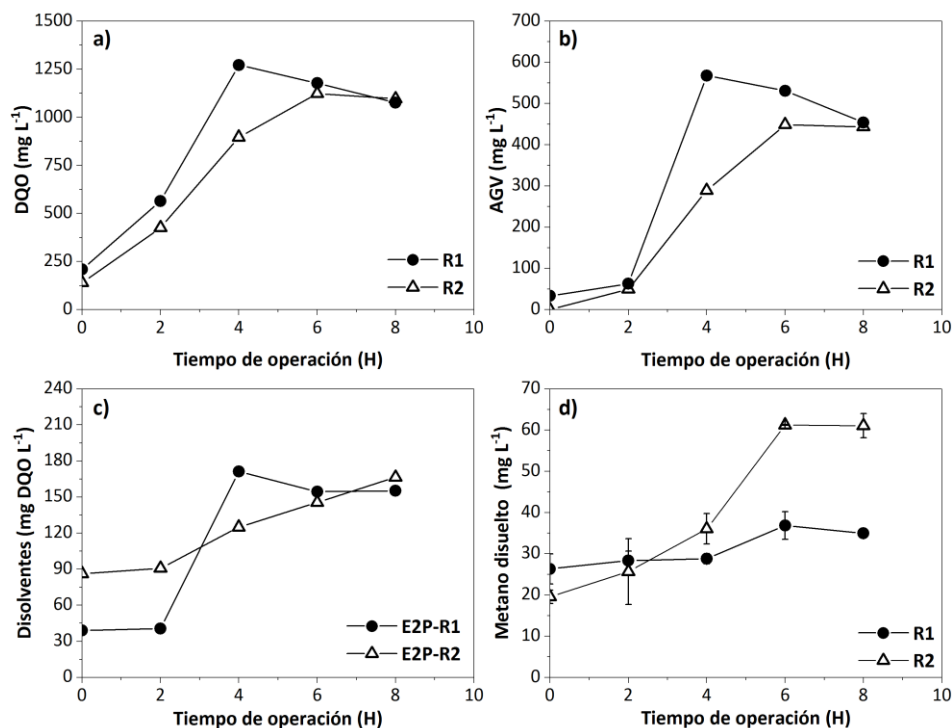


Figura 7.9. Respuesta dinámica de los reactores a la reanudación de la alimentación de disolventes orgánicos tras 8 horas sin suministro de sustrato: a) Concentración de materia orgánica, b) Concentración de ácidos grasos, c) Concentración de 1-etoxi-2-propanol y d) concentración de metano disuelto.

En cuanto a la evolución de la concentración de metano disuelto en el efluente de los reactores (Figura 7.9d), en el reactor R1 se observó un ligero aumento después de 4 horas desde la reanudación del suministro de sustrato. La concentración aumentó desde valores en torno a 28 mg L^{-1} hasta obtener un valor de 35 mg L^{-1} tras 8 horas de operación. En cambio, en el reactor R2, se observó el aumento gradual de la concentración de metano disuelto hasta alcanzar un valor de 61 mg L^{-1} , 1.7 veces superior respecto al valor máximo obtenido en el reactor R1. Este resultado resulta contradictorio, ya que al operar a una velocidad ascensional superior, se esperaría que la mayor agitación en el lecho mejorara la transferencia de metano desde la fase líquida hacia el espacio de cabeza del reactor, reduciéndose así la limitación de transferencia de materia por advección que tiene lugar en reactores de tipo UASB debido a la baja velocidad del líquido (Crone et al., 2016; Luo et al., 2016). La mayor concentración de metano disuelto en el efluente del reactor

R2 podría estar relacionada con la formación de microburbujas debido a la mayor velocidad ascensional, las cuales permanecerían atrapadas en el seno de la matriz líquida. Jeison y Chamy (1999) evaluaron el rendimiento de un reactor EGSB que trataba etanol con velocidades ascensionales del líquido en el intervalo entre 1.8 y 10.8 m h⁻¹, encontrando que éste decreció con el aumento de la velocidad de recirculación. Si bien estos autores no evaluaron la concentración de metano disuelto en función de la velocidad ascensional, señalaron que la turbulencia generada en el interior del reactor resultó en un aumento de la fracción de gas en el líquido, causando la disminución del rendimiento de metano.

El aumento de la concentración de metano disuelto en los sistemas hasta alcanzar un valor estable tras 6 horas de operación (Figura 7.9d) indica que, al reanudarse el aporte del sustrato orgánico, parte del metano producido se transfería a la fase acuosa para compensar la dilución efectuada durante las interrupciones nocturnas. Dado que la alimentación de agua con nutrientes y alcalinidad se realizaba de forma continua, en los periodos sin suministro de disolventes se producía la desgasificación de la solución en ausencia de aporte de metano. Este aspecto de la dinámica operacional de los reactores es de interés práctico, ya que la cantidad de metano que se transfiere a la fase líquida en el estado transitorio afecta al rendimiento de metano producido por unidad de materia orgánica degradada, y al balance global de bioenergía potencial del proceso de tratamiento. Con el fin de estimar la cantidad de metano transferida a la fase líquida durante el estado transitorio, se realizó un balance de metano disuelto en cada reactor. Dicha cantidad corresponde a la suma de la cantidad de metano en la corriente de salida del reactor y la cantidad de metano que se acumula en el mismo. La cantidad de metano transferida a la fase líquida se estimó en 1.0 L d⁻¹ en el reactor R1 y en 2.5 L d⁻¹ en el reactor R2, considerando la concentración de metano disuelto al reanudarse la alimentación del sustrato orgánico y la concentración tras 6 horas de operación, periodo tras el que se alcanzó el estado pseudo-estacionario Figura 7.9d.

A la vista de los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento de metano durante la operación intermitente de los reactores, se realizó un balance de materia orgánica a fin de determinar las diferentes fracciones en las que podría haber sido convertida, además de biogás. Para ello se determinó: la materia orgánica alimentada durante 16 horas de operación (DQO_{afuente}); la materia orgánica degradada (DQO_{degradada}), considerando el valor de la DQO del efluente tras 8 horas

desde la reanudación de la alimentación de disolventes; la materia orgánica captada como metano (DQO_{CH_4}); la materia orgánica correspondiente al metano disuelto, tanto en el efluente de los reactores, como el transferido a la fase líquida durante el estado transitorio ($DQO_{CH_4\text{-disuelto}}$); la materia orgánica convertida en biomasa (DQO_{biomasa}) y la materia orgánica convertida en sulfuro (DQO_{sulfuro}). De acuerdo con los análisis de cromatografía iónica del efluente de los sistemas, el consumo de sulfato fue próximo a 25 mg L^{-1} en el reactor R1 y a 28 mg L^{-1} en el reactor R2, dato que se empleó para determinar la materia orgánica convertida en sulfuros, asumiendo que todo el sulfato alimentado fue reducido por las bacterias sulfatoreductoras para la producción de H_2S . En la Tabla 7.5 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 7.5. Cuantificación de la materia orgánica en cada reactor durante un ciclo de operación.

	R1	R2
DQO_{afluente} (g)	67.6	67.6
DQO_{efluente} (g)	8.8	8.9
$DQO_{\text{degradada}}$ (g)	58.9	58.7
Volumen de CH_4 acumulado (L)	13.5	12.1
Y_{CH_4} ($Nm^3 \text{ kg } DQO^{-1}_{\text{degradada}}$)	0.230	0.206
$DQO_{CH_4^1}$ (g)	38.6	34.5
DQO_{biomasa^2} (g)	1.8	2.0
$DQO_{CH_4\text{-disuelto}}$ (g)	3.6	8.5
DQO_{sulfuro^3} (g)	0.2	0.2
% Recuperación de DQO (%)	78	80

¹Se determinó considerando el factor de conversión de $0.35 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg } DQO$.

²Se determinó de acuerdo con el Y_{xs} obtenido en cada reactor, 0.030 y $0.034 \text{ g } DQO \text{ CH}_4 \text{ DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ en los reactores R1 y R2, respectivamente.

³Se determinó considerando que, teóricamente, la reducción de 1 mol de SO_4^{2-} equivale a la reducción de 2 mol de O_2 , resultando en una relación $\text{g } DQO/\text{g } SO_4^{2-}$ de 0.67 .

La estimación de la materia orgánica recuperada en los dos reactores, respecto a la materia orgánica alimentada, se encuentra en un valor próximo al 80 %. En cuanto al 20 % no recuperado, junto con los errores propios de las determinaciones analíticas, se puede atribuir a la captación incompleta del metano en las primeras horas tras la reanudación del suministro de sustrato. En este periodo, el restablecimiento de las presiones hidrostáticas en el separador GLS mostró

variaciones del volumen en dicho separador, resultando en una subestimación del volumen de biogás producido.

7.2.4 Formación de biomasa granular

En este apartado se presentan los resultados correspondientes a la formación de biomasa granular y se describe la influencia del patrón de alimentación de sustrato orgánico en las características de la biomasa anaerobia, tales como el tamaño medio de partícula, la velocidad de sedimentación, la resistencia al esfuerzo cortante, la actividad metanogénica específica y la morfología de los gránulos.

Variación temporal del tamaño de partícula

En la Tabla 7.6 se muestran la variación temporal del porcentaje de gránulos y del diámetro medio de partícula en cada reactor. El porcentaje de gránulos, que corresponde al porcentaje de partículas con un tamaño superior a 300 μm , aumentó significativamente desde un valor del 5.7 % en el inóculo hasta valores del 62.6 % en el reactor R1 y del 51.9 % en el reactor R2 tras 20 días de operación. Durante este periodo se aplicaron dosis semanales de quitosano a fin de acelerar la formación de biomasa granular. Así, los resultados obtenidos en el día 20 evidenciaron una buena granulación en presencia del polímero en los reactores operando bajo condiciones de alimentación intermitente de sustrato orgánico. No obstante, como se expuso en el apartado 7.2.2, la dosis aplicada en el día 21 condujo a la flotación de la biomasa debido a la adhesión de burbujas de biogás a la superficie de los flóculos formados. Por ello, la aplicación periódica de quitosano fue momentáneamente interrumpida. Los resultados correspondientes al día 41 mostraron una disminución significativa del porcentaje de gránulos a valores del 21.8 % en el reactor R1 y del 31.6 % en el reactor R2, indicando que el proceso de granulación se vio afectado durante la operación intermitente de los reactores, bien debido a la flotación de las partículas de mayor tamaño, o por causa de la desintegración de los agregados formados. A fin de verificar esta hipótesis, en el día 42 se añadió una última dosis del polímero, evidenciándose nuevamente el aumento del porcentaje de gránulos en el día 61 hasta un valor del 72.4 % en el reactor R1 y del 46.3 % en el reactor R2, y la posterior disminución del mismo en el día 82 hasta valores del 41.4 y del 29.5 %, respectivamente. Esta evolución del porcentaje de gránulos indica, por una parte, que la adecuada dosificación de quitosano tiene un efecto positivo en la

granulación, pero por otra, muestra que el suministro intermitente de sustrato altera el proceso de maduración de aquellos gránulos formados.

Tabla 7.6. Variación temporal del diámetro medio de partícula y del porcentaje de gránulos en cada reactor.

		R1	R2	R1	R2
	Día	% de gránulos		Diámetro medio (μm)	
	0	5.7	5.7	85	85
Fase I	20	62.6	51.9	475	354
	41	21.8	31.6	187	238
Fase II	61	72.4	46.3	465	307
Fase III	82	41.4	29.5	312	224
Fase IV	106	71.1	52.2	562	386

En otros estudios en los que el quitosano se ha aplicado de manera periódica durante la operación de reactores anaerobios para mejorar la eficacia del proceso de degradación (Khemkhao et al., 2016) o para promover la formación de biomasa granular (El-Mamouni et al., 1998; Hudayah et al., 2012), no se ha reportado la flotación de biomasa. Este hecho sugiere que el fenómeno observado en este estudio está relacionado con las condiciones de operación aplicadas a los reactores, como las características del agua residual sintética, las características del inóculo, la alimentación intermitente de sustrato orgánico o la dosis de quitosano añadida. Las burbujas de gas tienden a adherirse de manera efectiva a las superficies hidrofóbicas; mientras que en contacto con superficies hidrofílicas tienden a minimizar su área de contacto y a abandonar la superficie (Thaveesri et al., 1995b). Por tanto, en reactores anaerobios en los que los productos principales del proceso de degradación son gases poco solubles en agua, metano y dióxido de carbono, las partículas con una superficie muy hidrofóbica son susceptibles a la flotación debido a la adhesión de burbujas de gas, causando la pérdida de biomasa y el deterioro de la eficacia de tratamiento. Goldberg et al. (1990) demostraron que en presencia de quitosano la hidrofobicidad celular aumenta, y señalaron que dicho aumento se debe a la pérdida de la electronegatividad superficial. Los resultados aquí expuestos sugieren que se produjo una sobredosificación de quitosano que propició el aumento excesivo de la hidrofobicidad de la superficie de los agregados, promoviendo a su vez la adhesión de las burbujas de biogás y el fenómeno de flotación.

Los resultados correspondientes al día 106 (Fase IV, con alimentación continua de sustrato orgánico) mostraron el aumento del porcentaje de gránulos a valores similares a los obtenidos en la Fase II, del 71.1 % para el reactor R1 y del 52.2 % para el reactor R2, pese a que no se realizaron más adiciones de quitosano a partir del día 42. El diámetro medio de partícula, al igual que el porcentaje de gránulos, se mostró oscilante durante las fases con alimentación intermitente, con valores comprendidos entre 187 y 475 μm en el reactor R1, y entre 224 y 354 μm en el reactor R2. Los valores más altos se obtuvieron en el día 106 en la fase con alimentación continua de sustrato orgánico, 562 μm en el fango del reactor R1 y 386 μm en el reactor R2. En este último reactor, el cual se operó con una velocidad ascensional del líquido mayor (3 m h^{-1}) a la del reactor R1 ($0.05\text{-}0.15 \text{ m h}^{-1}$), se obtuvieron gránulos con un tamaño de partícula inferior. Si bien en algunos estudios se ha demostrado que el aumento en la velocidad ascensional en reactores UASB favorece la formación de gránulos debido a una mayor presión selectiva (Alphenaar et al., 1993b; O'Flaherty et al., 1997), velocidades ascensionales superiores a 1 m h^{-1} pueden conducir a la desintegración de los gránulos debido a las fuerzas de cizalladura dentro del reactor (Tiwari et al., 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda la adición periódica de quitosano junto con la aplicación de velocidades superficiales inferiores a 3 m h^{-1} durante la puesta en marcha de reactores anaerobios con alimentación intermitente de sustrato orgánico.

En la Figura 7.10 se puede apreciar la variación temporal de la distribución de tamaño de partícula en cada reactor. El tamaño de partícula aumentó significativamente en ambos reactores para las diferentes muestras de fango analizadas en comparación con el inóculo, evidenciando la formación de agregados y de gránulos, incluso con un tamaño superior a $1000 \mu\text{m}$. Se puede observar, además, la disminución significativa del porcentaje de partículas con un tamaño inferior a $100 \mu\text{m}$ y el aumento del porcentaje de partículas con un tamaño entre 600 y $1000 \mu\text{m}$, alcanzando valores específicos del 42.4 % en el reactor R1 y del 24.6 % en el reactor R2 en el día 106.

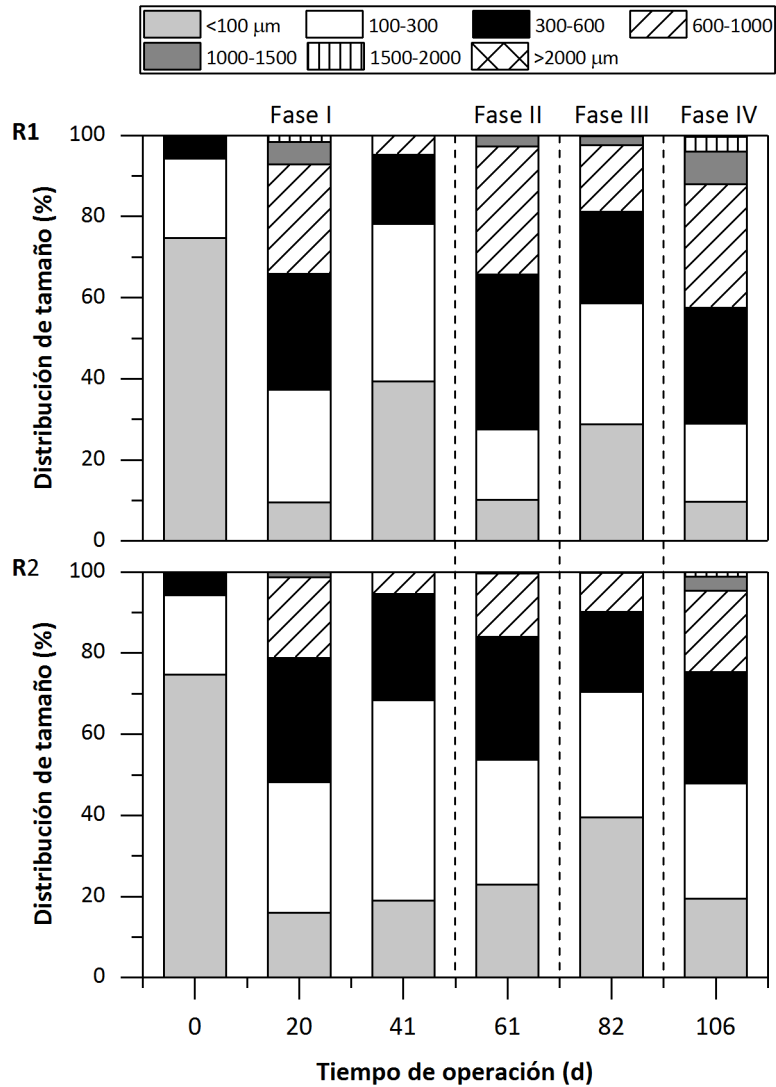


Figura 7.10. Variación temporal de la distribución de tamaño de partícula del fango anaerobio de cada reactor.

La velocidad de sedimentación de la biomasa formada y su resistencia al esfuerzo cortante se determinaron al finalizar el estudio. En la Tabla 7.7 se presentan los resultados obtenidos. Las velocidades de sedimentación obtenidas para la biomasa de ambos reactores, en torno a 20 m h^{-1} , se encuentran dentro del intervalo típico que describe gránulos anaerobios de buena calidad: $15 - 50 \text{ m h}^{-1}$ de

acuerdo con van Lier et al. (2008). Los coeficientes de integridad muestran que en el reactor R1 se formaron gránulos más resistentes a las fuerzas de cizalladura en comparación con los del reactor R2. Esto indica que la velocidad ascensional de 3 m h^{-1} fijada en el reactor R2 fue perjudicial para la integridad estructural de los gránulos, lo cual, además, justifica el menor tamaño de partícula de la biomasa formada en este reactor. Los coeficientes de integridad obtenidos fueron superiores a los reportados en un estudio que evaluaba la formación de gránulos en reactores UASB alimentados con un agua residual de alta salinidad, en el que los valores variaron entre 27.4 % y 74.7 % (Sudmalis et al., 2018). Pese a ello, el coeficiente de integridad tendió a decrecer con el tiempo de agitación en el ensayo. Por ejemplo, para los gránulos del reactor R2 el coeficiente de resistencia disminuyó desde un valor del 76.3 % hasta un valor de 56.5 % en el ensayo de resistencia con 5 min de agitación, lo cual indica que para mayores cargas de tratamiento, y por tanto, mayores velocidades de producción de biogás y de agitación, el aumento de las fuerzas de cizalladura podrían conducir a la erosión o a la desintegración de los gránulos (Syutsubo et al., 1997).

Tabla 7.7. Velocidad de sedimentación y resistencia de la biomasa formada en los reactores R1 y R2 al finalizar el estudio.

Reactor	Vs (m h^{-1})	CI ₂ (%)	CI ₃ (%)	CI ₅ (%)
R1	19.9	87.1	81.7	62.1
R2	22.4	76.3	67.4	56.5

Vs: velocidad de sedimentación; CI_t: coeficiente de integridad para cada tiempo evaluado en el ensayo de la medida de la resistencia de los gránulos, t (minutos).

Con el fin de establecer diferencias entre la biomasa presente en el lecho de reacción de los reactores y la biomasa flotante, al finalizar el experimento se analizaron algunos gránulos mediante microscopía electrónica de barrido. En las Figuras 7.11a-b y 7.12a-b se muestran las imágenes de microscopía electrónica de barrido de los gránulos del lecho de reacción de los reactores R1 y R2, respectivamente. Las Figura 7.11c-d y Figura 7.12c-d muestran gránulos flotantes extraídos de la zona de sedimentación. Respecto a los gránulos del lecho, en ambos reactores se observaron formaciones con una estructura rígida y una morfología elipsoidal. La magnificación de la superficie de los gránulos evidenció una densidad celular uniforme. En los gránulos del reactor R1, las colonias de microorganismos con morfología de bacilos son predominantes, mientras que en los gránulos del

reactor R2, se observó una población mixta de cocos, bacilos y filamentos. Los gránulos flotantes extraídos de ambos reactores fueron considerablemente más grandes que los gránulos del lecho, y la magnificación de su superficie permitió observar una densidad celular menos uniforme con espacios huecos, posiblemente debido a la autólisis celular derivada de las limitaciones de sustrato orgánico, resultando en agregados propensos a la flotación (Schmidt y Ahring, 1996).

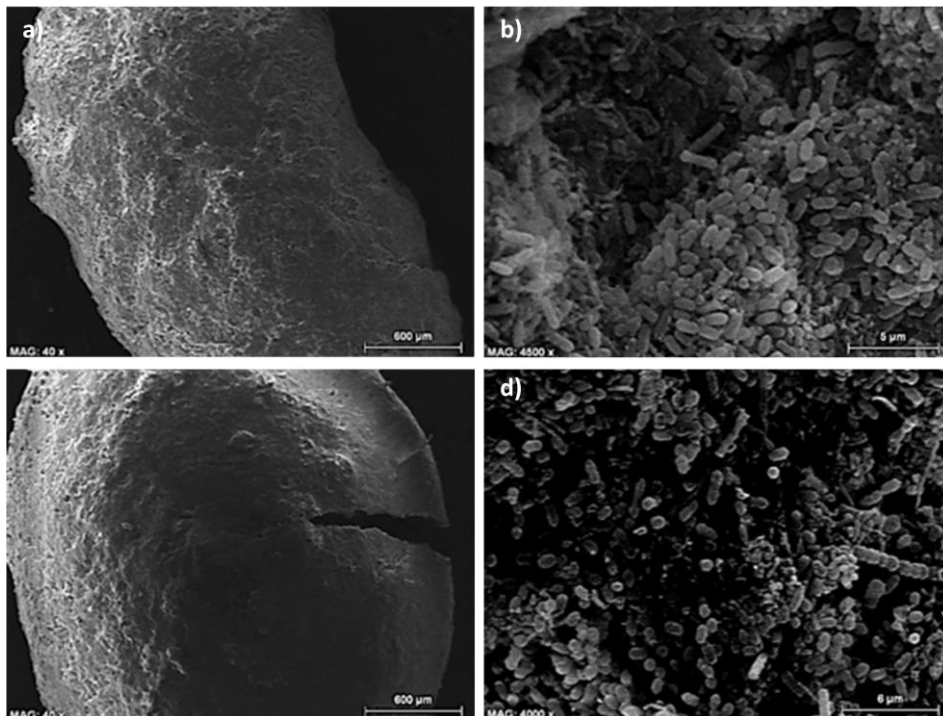


Figura 7.11. Microscopía electrónica de barrido de la morfología de los gránulos del reactor R1 al finalizar el estudio: a) y b) Gránulo del lecho de reacción y magnificación de su superficie (4000x), c) y d) Gránulo flotante de la zona de sedimentación y magnificación de su superficie (4500x).

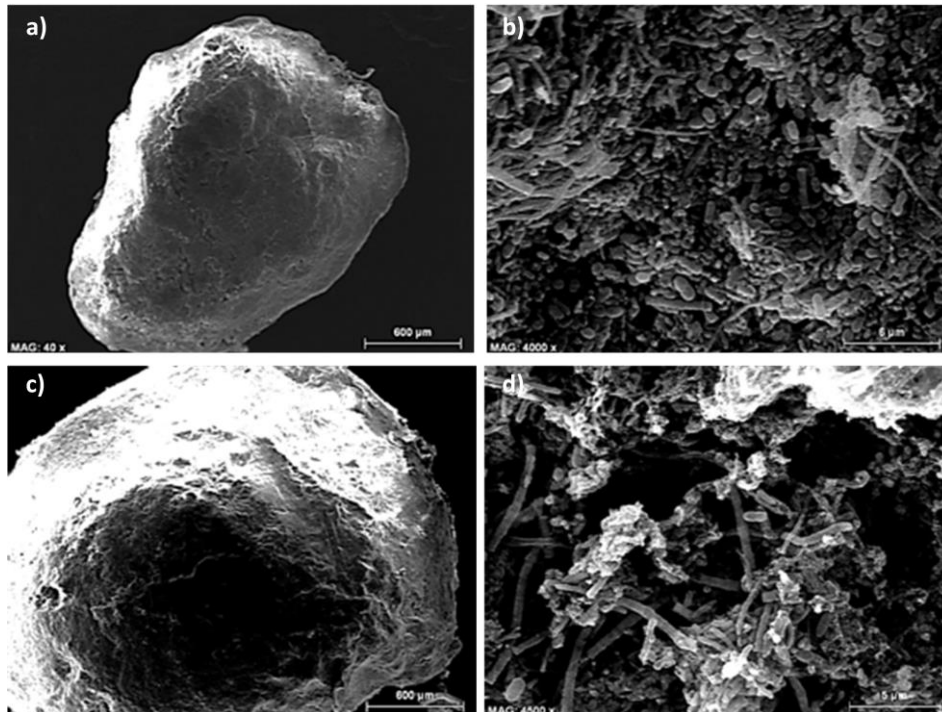


Figura 7.12. Microscopía electrónica de barrido de la morfología de los gránulos del reactor R2 al finalizar el estudio: a) y b) Gránulo del lecho de reacción y magnificación de su superficie (4000x), c) y d) Gránulo flotante de la zona de sedimentación y magnificación de su superficie (4500x).

Actividad metanogénica específica y potencial bioquímico de metano

Al finalizar el estudio se evaluó la actividad metanogénica específica y el potencial bioquímico de metano del fango desarrollado en cada reactor. Los ensayos para la determinación de estos parámetros se realizaron a 25 °C utilizando como sustrato orgánico cada uno de los componentes de la mezcla ternaria de disolventes orgánicos: etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, así como la mezcla de éstos en una proporción másica 7:2:1. La concentración de sustrato orgánico y la relación inóculo sustrato se establecieron en valores de 3 g DQO L⁻¹ y 2.1 g SSV g DQO⁻¹, respectivamente.

En la Figura 7.13 se muestra el volumen acumulado de metano producido a partir de la degradación de los sustratos evaluados con el fango de cada reactor.

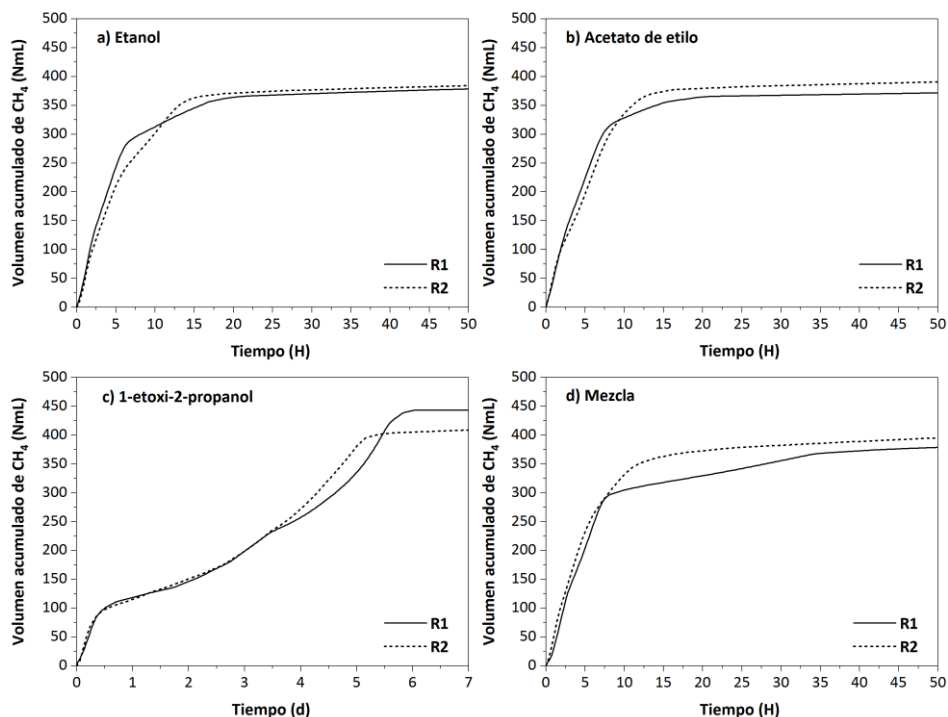


Figura 7.13. Producción de metano acumulado durante la degradación de 3.0 g DQO L^{-1} de: a) etanol, b) acetato de etilo, c) 1-etoxi-2-propanol (E2P) y d) la mezcla ternaria de disolventes orgánicos en relación másica 7:2:1 para el fango anaerobio de cada reactor.

Las curvas de producción de metano para el fango desarrollado en ambos reactores presentaron similitud durante el transcurso del ensayo para todos los sustratos evaluados. Estas curvas muestran una producción continua de metano que tiene lugar a una mayor velocidad durante las primeras horas del ensayo. Conforme el agotamiento del sustrato y la formación de metano proceden, la velocidad de producción disminuye hasta que se alcanza el máximo volumen de metano acumulado. Para el etanol (Figura 7.13a) y el acetato de etilo (Figura 7.13b) la máxima producción de metano ocurrió en un periodo inferior a 30 horas, mientras que para la degradación del 1-etoxi-2-propanol fueron necesarios alrededor de 5 y 5.5 días con el fango de los reactores R1 y R2, respectivamente (Figura 7.13c), ratificando la menor velocidad de degradación de este disolvente orgánico. Para la mezcla de disolventes la producción total de metano también tuvo lugar en un

periodo inferior a 30 horas, como cabría esperar, debido a la mayor proporción de etanol en la mezcla (Figura 7.13d). Tal y como en los ensayos realizados en el estudio presentado en el Capítulo 5, la producción de metano a partir del 1-etoxi-2-propanol ocurrió en dos etapas. Estas etapas se encuentran asociadas a las diferentes velocidades a las que tiene lugar la degradación de los productos intermedarios.

En la Tabla 7.8 se recogen los resultados del potencial bioquímico de metano, la actividad metanogénica y el porcentaje de recuperación de metano para los ensayos realizados con el fango de cada reactor. En esta tabla se muestra, además, la eficacia de eliminación del carbono orgánico total en cada ensayo. El potencial bioquímico de metano de los sustratos evaluados con el fango de ambos reactores mostró valores similares, en el intervalo comprendido entre 292 y 341 CH_4 NmL $\text{g DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$. Los porcentajes de recuperación, entre el 83 y el 97 %, y las eficacias de eliminación del carbono orgánico superiores al 95 % indicaron la elevada conversión del sustrato en metano.

Tabla 7.8. Potencial bioquímico de metano, actividad metanogénica específica y porcentaje de recuperación de metano del fango de cada reactor para la degradación de diferentes sustratos orgánicos.

	Etanol		Acetato de etilo		1-etoxi-2-propanol		Mezcla	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
PBM	299 ± 5	303 ± 4	292 ± 5	308 ± 10	341 ± 9	321 ± 5	300 ± 5	314 ± 13
AME	574 ± 20	536 ± 6	520 ± 13	518 ± 19	110 ± 1	142 ± 11	510 ± 6	500 ± 6
ER _{CH₄}	85 ± 2	87 ± 1	83 ± 1	88 ± 3	97 ± 3	92 ± 1	86 ± 2	90 ± 4
EE _{COT}	98	97	98	99	97	96	96	95

PBM: potencial bioquímico de metano ($\text{NmL CH}_4 \text{ g DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$); AME: actividad metanogénica específica ($\text{NmL CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$); ER_{CH₄}: eficacia de recuperación de metano (%); EE_{COT}: eficacia de eliminación del carbono orgánico total (%).

Respecto a los resultados de la actividad metanogénica específica, los valores mayores se obtuvieron en los ensayos en los que se evaluó la degradación del etanol, con un valor de $574 \pm 20 \text{ NmL CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para el fango del reactor R1 y de $536 \pm 6 \text{ NmL CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para el fango del reactor R2. Enright et al. (2005) reportaron una actividad metanogénica similar, de $594 \text{ mL CH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, para la degradación de etanol a 37 °C con un fango granular adaptado al tratamiento psicrófilico de un agua residual compuesta por etanol, ácido acético, metanol,

acetona y propanol, tras 450 días de operación de un reactor EGSB. En los ensayos correspondientes al acetato de etilo y a la mezcla de disolventes orgánicos se obtuvieron valores similares en el intervalo de 500 a 520 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹. La menor actividad metanogénica específica se obtuvo en los ensayos con el 1-etoxi-2-propanol, con valores de 109 y 142 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ empleando el fango del reactor R1 y del reactor R2, respectivamente.

7.2.5 Estructura de las comunidades microbianas.

El análisis de la variación temporal de la estructura de las comunidades microbianas de los reactores se presenta en este apartado. Dicho análisis se llevó a cabo con el fin de relacionar la funcionalidad de las poblaciones microbianas desarrolladas en los sistemas con las condiciones operacionales y el rendimiento de los mismos. La estructura de las comunidades microbianas del inóculo y de los reactores R1 y R2 tras 110 días de operación se evaluó mediante la técnica de secuenciación de alto rendimiento Illumina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.14 a nivel de: a) filo, b) clase, c) orden y d) género para los grupos taxonómicos con una abundancia relativa superior al 1.0 % en al menos una de las muestras analizadas. Los filos predominantes en el inóculo corresponden a *Bacteroidetes* (22.8 %), *Proteobacteria* (21.2 %), *Acetothermia* (10.4 %), *Synergistetes* (6.6 %), *Cloacimonetes* (6.6 %) y *Firmicutes* (5.7%). Cabe destacar la baja abundancia relativa del filo *Euryarchaeota* (0.8 %). Tras 106 días de operación, se observó un cambio en la estructura microbiana de ambos reactores con una sucesión de la predominancia hacia los filos *Euryarchaeota*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, y *Firmicutes*. Dichos filos contabilizaron el 77.5 y el 66.6 % del total de las secuencias en los reactores R1 y R2, respectivamente, y se han identificado como predominantes en reactores anaerobios empleados para el tratamiento de aguas residuales de origen industrial (Antwi et al., 2017; Connelly et al., 2017), incluidas aguas residuales contaminadas con compuestos de síntesis química (Song et al., 2017). En el inóculo se observó una comunidad microbiana más diversa como lo reflejó el índice de diversidad de Shannon, con un valor de 6.76, en comparación con valores de 6.03 y 5.50 en el reactor R1 y en el reactor R2, respectivamente, indicando la adaptación de los reactores a las condiciones operacionales del estudio (Fykse et al., 2016).

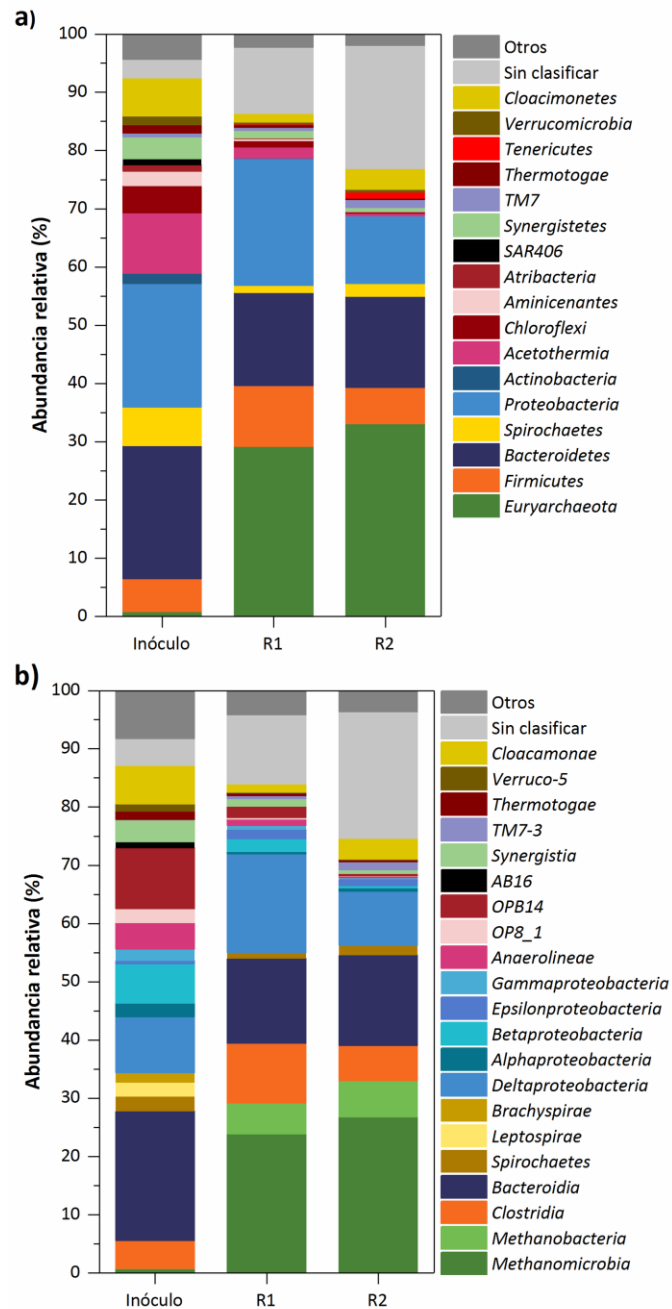


Figura 7.14. Estructura de las comunidades microbianas del inóculo y del fango de los reactores R1 y R2 tras 106 de operación a nivel de: a) filo, b) clase.

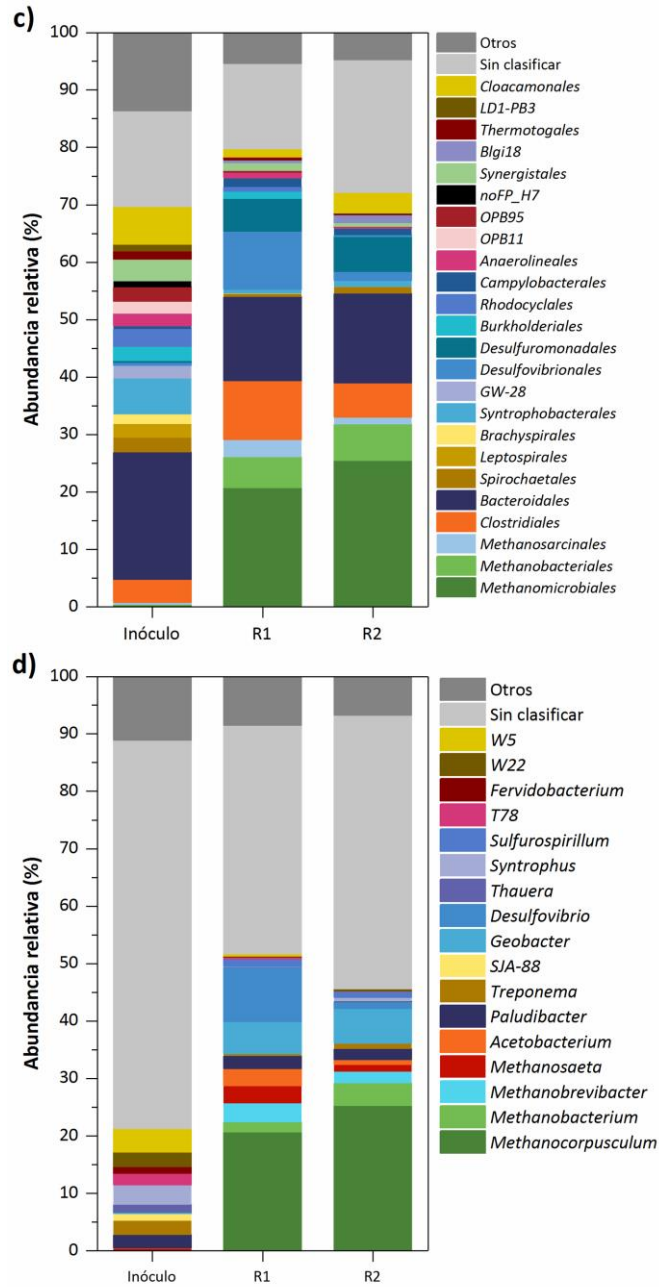


Figura 7.14. (Continuación). Estructura de las comunidades microbianas del inóculo y del fango de los reactores R1 y R2 tras 106 de operación a nivel de: c) orden y d) género.

En el dominio Bacteria, la abundancia relativa del filo *Proteobacteria* se mantuvo estable en el reactor R1 con un valor del 21.8 %, mientras que en el reactor R2 decreció hasta un valor del 11.6 %, indicando que la velocidad ascensional del líquido indujo a un cambio en la estructura microbiana de los reactores. Luo et al. (2016) reportaron un resultado semejante en un estudio en el cual se evaluó la influencia de la velocidad de recirculación externa en la operación y la estructura de las comunidades microbianas de un reactor de circulación interna. Operando sin recirculación externa —con una velocidad ascensional del líquido 17 veces inferior a la obtenida con la aplicación de la corriente de recirculación—, los autores observaron la predominancia del filo *Proteobacteria*.

Por otra parte, la abundancia relativa del filo *Bacteroidetes* decreció respecto al valor inicial del inóculo hasta valores del 16.0 % en el reactor R1 y del 15.6 % en el reactor R2. Las bacterias pertenecientes al filo *Bacteroidetes* están involucradas en las etapas de hidrólisis y acidogénesis del proceso de degradación anaerobia (Regueiro et al., 2012). La composición mayoritaria de etanol en el afluente, cuya degradación se lleva a cabo principalmente mediante la interacción sintrófica entre bacterias acetogénicas y microorganismos consumidores de hidrógeno, pudo conducir a la disminución de la abundancia de las bacterias pertenecientes a este filo. Pese a la reducción observada, la alta abundancia de *Bacteroidetes* en los sistemas sugiere que, bien los microorganismos asociados contribuyeron a la degradación de los sustratos más complejos en la mezcla ternaria —acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol—, o bien que la presión selectiva inducida por el sustrato y las condiciones de operación de los ensayos no fue suficiente para disminuir en una mayor proporción su dominancia. En contraste, la abundancia relativa del filo *Firmicutes* aumentó hasta valores del 10.5 % en el reactor R1 y del 6.2 % en el reactor R2. Si bien las bacterias del filo *Firmicutes* también son conocidas por participar en la fermentación de compuestos orgánicos complejos (Gomes de Barros et al., 2017; Kampmann et al., 2012), algunas especies pertenecientes a este filo son microorganismos sintróficos que desempeñan un papel importante en la degradación de ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios (Fykse et al., 2016). Así, el aumento de la abundancia relativa de este filo en ambos reactores sugiere que los microorganismos asociados pudieron efectuar un papel importante en la degradación los disolventes orgánicos más complejos, o de los productos intermediarios de la degradación de los mismos.

A nivel de clase se observó un cambio en la estructura de las poblaciones de los reactores respecto a las que se encontraban inicialmente en el inóculo. La abundancia relativa de clases como *Bacteroidia* (22.2 %), *OPB14* (10.4 %), *Betaproteobacteria* (6.8 %), *Cloacamonae* (6.6 %), *Anaerolinea* (4.6 %), *Synergistia* (3.8 %) y *Spirochaetas* (2.5 %) disminuyó en los dos reactores tras 106 días de operación. Por otra parte, la abundancia relativa de la clase *Clostridia* (perteneciente al filo *Firmicutes*) aumentó desde un valor del 4.8 % en el inóculo hasta valores del 10.2 y del 6.0 % en los reactores R1 y R2, respectivamente. La mayoría de las secuencias de esta clase se asociaron al orden *Clostridiales* (Figura 7.14c), el cual incluye bacterias capaces de degradar sustratos complejos como proteínas, lípidos y carbohidratos, así como sustratos acetogénicos como ácidos grasos volátiles y etanol en asociación sintrófica con otros microorganismos (Plugge y Stams, 2005; Stieb y Schink, 1985). Algunas especies pertenecientes a este orden pueden efectuar la oxidación sintrófica del acetato (McInerney et al., 2008). La abundancia relativa de la clase *Deltaproteobacteria*, cuyo valor en el inóculo fue del 9.6 %, aumentó en el reactor R1 hasta un valor del 16.9 %, mientras que en el reactor R2 se mantuvo prácticamente igual con un valor del 9.3 %. En ambos reactores se evidenció un cambio en las comunidades microbianas pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria* respecto a las observadas en el inóculo.

Dentro de la clase *Deltaproteobacteria*, el orden *Syntrophobacterales*, que incluye a microorganismos capaces de llevar a cabo la degradación de compuestos aromáticos y de ácidos grasos en asociación sintrófica con microorganismos hidrogenotróficos (Müller et al., 2010; Narihiro et al., 2012), fue predominante en el inóculo con una abundancia relativa del 6.2 % del total de las secuencias; mientras que decreció a valores del 0.7 % en el reactor R1 y del 1.1 % en el reactor R2. En contraste, la abundancia relativa del orden *Desulfuromonadales* aumentó desde un valor del 0.3 % en el inóculo, hasta valores del 5.7 % en el reactor R1 y del 6.1 % en el reactor R2. La mayoría de las secuencias de dicho orden pertenecen al género *Geobacter* (>98 % en ambos reactores). La abundancia relativa del orden *Desulfovibrionales* también aumentó respecto al valor del 0.5 % observado en el inóculo, especialmente en el reactor R1, en el que dicho orden fue predominante con un valor del 10.1 %, mientras que en el reactor R2, su abundancia fue del 1.6 %, con la mayoría de las secuencias pertenecientes a las bacterias sulfatoreductoras del género *Desulfovibrio*. Así pues, aunque en ambos reactores se produjo un cambio en los microorganismos predominantes dentro de la clase *Deltaproteobacteria* (perteneciente al filo *Proteobacteria*) respecto al inóculo, la

mayor predominancia de las bacterias del género *Desulfovibrio* en el reactor R1 podría estar relacionada con la menor velocidad ascensional del líquido en dicho reactor. Las especies del género *Desulfovibrio* pueden alternar su función metabólica entre la reducción del sulfato y la degradación sintrófica de sustratos (Meyer et al., 2013). Por ejemplo, *D. vulgaris* es una bacteria sulfatoreductora que acopla la oxidación de sustratos característicos como el H₂, el etanol y el lactato con la reducción de sulfato a sulfuro (Walker et al., 2009). En ausencia de sulfato, este microorganismo puede crecer sintróficamente con microorganismos hidrogenotróficos a partir de la oxidación del etanol (Walker et al., 2009; Schink 1997). La predominancia de *Desulfovibrio* y de *Geobacter* se ha reportado en reactores UASB aplicados al tratamiento de aguas residuales contaminadas con etanol (Shrestha et al., 2014; Zhao et al., 2016). Zhao et al. (2016) observaron el aumento de la abundancia del género *Desulfovibrio* en reactores UASB alimentados con propionato y butirato, y enriquecidos con la adición de etanol para estimular la transferencia directa de electrones entre especies y el metabolismo sintrófico entre las comunidades microbianas. Hu et al. (2015) encontraron que, en un reactor UASB alimentado con etanol y acetato, con una alta relación DQO/SO₄²⁻ (igual a 20), las bacterias del género *Geobacter* desempeñaron un papel más importante en la oxidación del sustrato orgánico en comparación con las bacterias sulfatoreductoras del género *Desulfovibrio*. Estas últimas bacterias efectuaron la degradación del etanol acoplada a la reducción del sulfato sólo cuando se estableció una baja relación DQO/SO₄²⁻ en el medio (igual a 0.5). Debido a la baja disponibilidad de sulfato en el afluente de los reactores estudiados en este capítulo, la función metabólica de las especies de *Desulfovibrio* estaría asociada a la degradación sintrófica del agua residual sintética alimentada.

En el dominio Arquea, el filo *Euryarchaeota*, que incluye las arqueas metanogénicas, fue el filo predominante en el fango anaerobio de los dos reactores, aumentando su abundancia relativa desde un valor del 0.8 % en el inóculo, hasta un valor del 29.2 % en el reactor R1 y del 33.1 % en el reactor R2. A nivel de clase, *Methanobacteria* y *Methanomicrobia* fueron las clases más abundantes, con valores del 5.3-6.3 % y del 23.8-26.8 % en los reactores R1 y R2, respectivamente. Los tres órdenes encontrados habitualmente en ambientes anaerobios (Stams y Plugge 2009), *Methanobacteriales* (5.3-6.3 %), *Methanomicrobiales* (20.8-25.5 %) y *Methanosarcinales* (3.8-1.3 %) se identificaron en ambos reactores (Figura 7.14c). A nivel de género, la mayoría de las secuencias obtenidas se asociaron con microorganismos hidrogenotróficos pertenecientes a *Methanocorpusculum* 20.7-

25.3 %, *Methanobacterium* 1.7-3.9 % y *Methanobrevibacter* 3.3-2.0 % (Figura 7.14d). El género *Methanosaeta*, cuya abundancia relativa en el inóculo fue del 0.3 %, aumentó a valores del 3.3 % en el reactor R1 y del 1.3 % en el reactor R2. Si bien la presencia de microorganismos hidrogenotróficos (*Methanocorpusculum*, *Methanobacterium* y *Methanobrevibacter*) y acetoclásticos (*Methanosaeta*) indica que la producción de metano se efectuó mediante ambas rutas metabólicas, la dominancia de los primeros sobre los segundos sugiere que la metanogénesis hidrogenotrófica desempeña un papel más importante en la producción de metano a partir de la mezcla de disolventes orgánicos alimentada a los reactores. Estos resultados son consistentes con otros estudios en los que se ha encontrado la dominancia de los metanógenos hidrogenotróficos sobre los acetoclásticos en reactores aplicados al tratamiento de sustratos orgánicos diversos (O'reilly et al., 2010; Luo et al., 2016; Song et al., 2010; Connelly et al., 2017) (Connelly et al., 2017; Luo et al., 2016; O'Reilly et al., 2010; Song et al., 2010), y con los resultados obtenidos en los capítulos expuestos anteriormente, en los que, con inóculos distintos, *Methanocorpusculum* fue el microorganismo metanogénico predominante. Estos resultados indican que, en los reactores estudiados bajo las condiciones operacionales aplicadas, se favoreció el crecimiento de los microorganismos pertenecientes al género *Methanocorpusculum*, y demuestran que su presencia fue importante para la degradación del agua residual contaminada con disolventes orgánicos de interés en la industria flexográfica a partir de un fango en suspensión.

7.3 ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN REACTORES DE ALTA CARGA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE OPERACIÓN

En esta sección se realiza el estudio comparativo de la estructura microbiana del fango desarrollado en los experimentos en los que se utilizó quitosano como coadyuvante del proceso de granulación. El estudio comparativo tiene por finalidad relacionar las comunidades predominantes encontradas en 5 reactores con las condiciones de operación establecidas y con el proceso de formación de biomasa granular durante el tratamiento de un agua residual contaminada con la mezcla de disolventes orgánicos de interés. En la Tabla 7.9 se presentan las muestras seleccionadas para el estudio comparativo con la indicación del ensayo al que corresponden, el modo de operación y la duración del mismo. En la Figura 7.15 se muestra la estructura microbiana de las muestras analizadas a nivel de filo (Figura 7.15a) y de género (Figura 7.15b).

Tabla 7.9. Muestras analizadas en el estudio comparativo de la estructura de las comunidades microbianas.

Estudio	Alimentación de sustrato orgánico	Duración (días)	Muestras analizadas	Nomenclatura
Capítulo 5	En continuo	169	Inóculo I	Inóculo I
			R1 (sin quitosano)	R1_C5 (SQ)
			R2 (con quitosano)	R2_C5 (CQ)
Capítulo 6	Intermitente	147	R1 (sin quitosano)	R1_C6 (SQ)
			R2 (con quitosano)	R2_C6 (CQ)
Capítulo 7	Intermitente	106	Inóculo II	Inóculo II
			R1 (con quitosano)	R1_C7 (CQ)

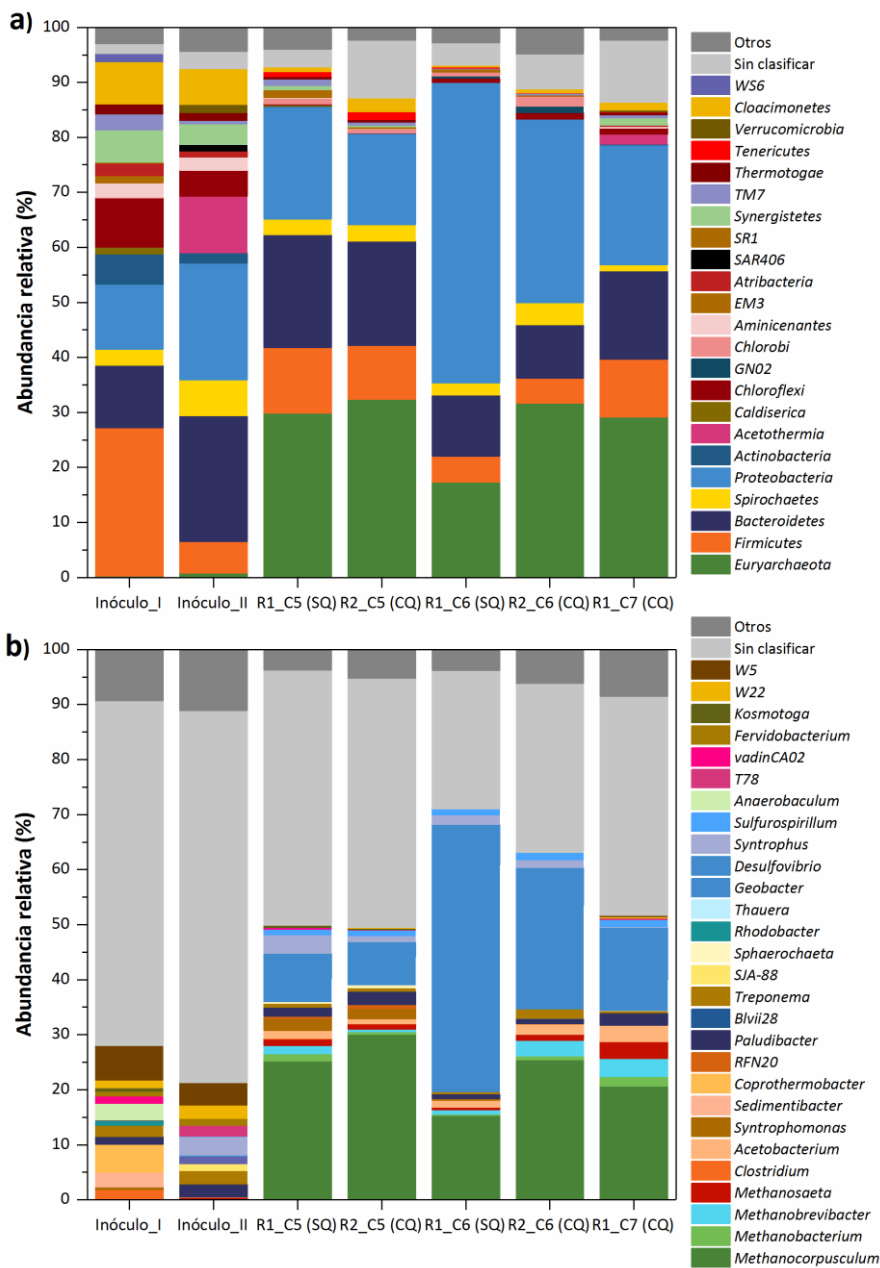


Figura 7.15. Estructura de las comunidades microbianas de los inóculos empleados y de varios fangos desarrollados en los estudios (C5, C6 y C7) llevados a cabo durante el desarrollo de la tesis doctoral a nivel de: a) filo y b) género.

En los dos inóculos empleados durante el estudio, Inóculo I e Inóculo II, se observó una estructura similar de las comunidades microbianas a nivel de filo, siendo predominantes los filios *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria* y *Cloacimonetes*, representado entre el 61.0 y el 66.7 % del total de las secuencias, aunque difirieron en su abundancia relativa. Así, por ejemplo, el filo *Firmicutes* fue predominante en el Inóculo I con una abundancia relativa del 27.0 %, mientras que en el Inóculo II este filo presentó una abundancia relativa del 5.7 %. Asimismo, la abundancia del filo *Bacteroidetes* en el Inóculo I fue del 11.2 %, frente a un 22.8 % en el Inóculo II. Este resultado sugiere que, en el periodo entre la toma de los inóculos, las condiciones operacionales del digestor anaerobio de la EDAR Quart-Benager (19 meses) pudieron variar, resultando en cambios en la abundancia de los microorganismos presentes. Cabe resaltar que el Inóculo I fue tomado en invierno, mientras que el inóculo II se tomó en verano, siendo por tanto mayor la temperatura de teste último. La temperatura del digestor pudo afectar la estructura de las comunidades microbianas en cuanto a su abundancia. En el Inóculo II destacó la presencia del filo *Acetothermia* con una abundancia relativa del 10.4 %, mientras que en el Inóculo I dicho filo no se detectó. Miembros de este filo se han encontrado previamente en digestores anaerobios donde, posiblemente, realizan la degradación de algunos productos solubles (como aminoácidos) generados por las bacterias hidrolíticas (Hao et al., 2018; Jia et al., 2016). El filo *Euryarchaeota* estuvo presente en ambos inóculos con abundancias relativas del 0.3 % en el Inóculo I y del 0.8 % en el Inóculo II. A nivel de género, predominaron las especies de *W5* en los dos inóculos, con una abundancia relativa del 4.1-6.3 %. El género *Treponema* presentó abundancias similares en ambos reactores: del 2.1 % en el Inóculo I y del 2.4 % en el Inóculo II. Por otra parte, los géneros *Coprothermobacter* y *Anaerobaculum* sólo se detectaron en el Inóculo I, con abundancias relativas del 5.1 y del 3.0 %, respectivamente. El género *Syntrophus* se detectó en el Inóculo II con una abundancia relativa del 3.4 %, mientras que en el Inóculo II la abundancia de este género fue del 0.02 %.

En todos los fangos analizados al terminar la operación de los reactores, independientemente del patrón de alimentación aplicado y de la operación con la dosificación de quitosano o sin ella, se observó una estructura de las comunidades microbianas similar, tanto a nivel de filo como a nivel de género. En todos ellos predominaron bacterias pertenecientes a los filios *Firmicutes* (4.5-11.9 %), *Bacteroidetes* (9.7-20.4 %) y *Proteobacteria* (16.6-54.6 %). Cabe destacar que la

abundancia relativa del filo *Bacteroidetes* disminuyó entre un 6.8 y un 9.4 %, respecto al inóculo, en los experimentos con alimentación intermitente de sustrato orgánico, mientras que en los experimentos con alimentación continua aumentó desde un valor inicial del 11.2 % hasta valores próximos al 20 % en los reactores con y sin adición de quitosano, mostrando así una respuesta diferente de este filo ante el patrón de alimentación de sustrato. Dentro del filo *Proteobacteria* se detectaron bacterias capaces de llevar a cabo la degradación sintrófica de sustratos como el etanol, siendo *Geobacter* y *Desulfovibrio* los géneros predominantes en todos los reactores, aumentando su abundancia relativa desde valores inferiores al 0.2 % en los inóculos (procedentes del digestor anaerobio) a valores en intervalo entre el 4.1 y el 41.2 % y entre el 2.7 y el 9.5 %, respectivamente. Las mayores abundancias relativas del género *Geobacter* se detectaron en el estudio correspondiente al Capítulo 6. Las bacterias pertenecientes a este género se encontraban en los inóculos provenientes del estudio con alimentación continua de agua residual, y aumentaron su abundancia relativa tras de 147 días de operación con suministro intermitente de la misma.

En los estudios correspondientes a los Capítulos 5 y 7 de granulación con alimentación continua e intermitente de sustrato orgánico, en los que se utilizaron para la puesta en marcha de los reactores el Inóculo I y el Inóculo II, respectivamente, se observó un incremento considerable de la abundancia relativa del filo *Euryarchaeota*. Dicho filo alcanzó valores entre el 29.9 y el 32.4 % desde un valor inferior al 0.8 % en ambos inóculos. La mayoría de las secuencias que se identificaron en este filo pertenecen a especies del género *Methanocorpusculum*, con abundancias relativas que representaron entre el 20.7 y el 30.1 % del total de las secuencias del fango de los reactores. En el estudio correspondiente al Capítulo 6, en el que se utilizó como inóculo el fango granular desarrollado en el estudio previo para operar los reactores con alimentación intermitente de agua residual, *Methanocorpusculum* mantuvo su predominancia, aunque se observó la disminución de su abundancia relativa desde un valor del 25.3 % hasta un valor del 15.4 % en el reactor operado sin la adición de quitosano, R1_C6 (SQ), y del 30.1 al 25.5 % en el reactor con adición periódica del polímero, R2_C6 (CQ). Las especies del género *Methanocorpusculum*, como se ha mencionado en capítulos anteriores, son metanógenos hidrogenotróficos que emplean hidrógeno, formiato e isopropanol para la formación de metano, pero son incapaces de utilizar alcoholes primarios como el etanol. La dominancia de los microorganismos de este género junto con la ausencia de metanógenos capaces de utilizar el etanol, indica que la degradación

hasta metano del sustrato orgánico alimentado se produjo mediante interacciones sintróficas entre bacterias y microorganismos metanogénicos. La baja concentración de ácido acético en los reactores evaluados, particularmente en los ensayos del Capítulo 5 y del Capítulo 6, la alta abundancia de metanógenos hidrogenotróficos y la baja abundancia relativa de arqueas metanogénicas acetoclásticas, sugieren que la ruta de oxidación sintrófica del acetato pudo tener lugar durante el tratamiento del agua residual contaminada con los disolventes orgánicos. No obstante, se requieren estudios específicos para confirmar esta hipótesis.

Así pues, en todos los experimentos, las bacterias de los géneros *Geobacter* y *Desulfovibrio*, y los metanógenos hidrogenotróficos del género *Methanocorpusculum* fueron predominantes, pese a que se evaluaron condiciones operacionales diferentes, como la concentración de disolventes en el afluente, el tiempo de retención hidráulico, la carga orgánica y la velocidad ascensional del líquido, además del patrón de alimentación del sustrato. Por todo ello, se puede concluir que la fuente de carbono orgánico suministrado fue el factor determinante en la variación de la estructura de las comunidades microbianas de los reactores de alta carga empleados para el tratamiento de los disolventes orgánicos de interés industrial estudiados en esta tesis doctoral.

7.4 CONCLUSIONES

En el estudio presentado en este capítulo se ha evaluado la formación de biomasa granular en dos reactores de flujo ascendente alimentados de manera intermitente con un agua residual sintética contaminada con los disolventes orgánicos etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, adicionados periódicamente con quitosano. Las conclusiones que se extraen a partir de los resultados obtenidos se exponen a continuación.

Se ha demostrado que es posible desarrollar un fango granular anaerobio a partir de un fango en suspensión en reactores de flujo ascendente alimentados intermitentemente con el agua residual sintética que contiene los disolventes orgánicos etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol.

Se pusieron en marcha dos reactores de flujo ascendente, R1 y R2, operando con velocidades ascensionales del líquido diferentes, de 0.05-0.15 m h⁻¹ y 3.0 m h⁻¹, respectivamente, y con adiciones periódicas de quitosano. En ambos sistemas se efectuó el tratamiento de una carga orgánica máxima de 13 kg DQO m⁻³ d⁻¹ aplicada en un patrón intermitente de 16 h al día durante 7 días a la semana, obteniendo eficacias de eliminación superiores al 90 %. Los resultados demostraron, además, la capacidad de los sistemas para alcanzar un estado pseudo-estacionario bajos los ciclos de operación aplicados, demostrando a su vez la adaptabilidad de los microorganismos a los periodos sin suministro de sustrato orgánico y la recuperación de su actividad cuando la reanudación del mismo tiene lugar. No obstante, durante las fases de operación con alimentación intermitente se obtuvieron rendimientos de metano relativamente bajos, en el intervalo comprendido entre 0.189 y 0.242 Nm³ CH₄ kg DQO⁻¹_{degradada} en el reactor R1 y entre 0.180 y 0.233 Nm³ CH₄ kg DQO⁻¹_{degradada} en el reactor R2. El cambio a alimentación continua de sustrato en la última fase del experimento evidenció la obtención de rendimientos de metano más cercanos al valor estequiométrico: 0.313 ± 0.031 Nm³ CH₄ kg DQO⁻¹_{degradada} en el reactor R1 y 0.304 ± 0.014 Nm³ CH₄ kg DQO⁻¹_{degradada} en el reactor R2. Este resultado indicó que la dinámica operacional de los reactores en condiciones de alimentación intermitente afectó a la captación de metano.

En cuanto a las características de la biomasa granular, tras 20 días de operación se evidenció la presencia de gránulos en porcentajes del 62.6 % en el reactor R1 y del 51.9 % en el reactor R2. El porcentaje de gránulos en las distintas fases del estudio varió aumentando tras las adiciones de quitosano. El suministro intermitente de sustrato afectó negativamente a la maduración de los gránulos formados, observándose reducciones en el porcentaje de gránulos en los periodos sin adición de quitosano. Tras 98 días de alimentación intermitente de sustrato orgánico, el cambio a alimentación continua mostró un aumento en el porcentaje de gránulo y en su tamaño.

Las características fisicoquímicas de la biomasa granular obtenida se encuentran dentro de los intervalos especificados en la bibliografía para describir gránulos anaerobios de buena calidad, con una velocidad de sedimentación próxima a un valor de 20 m h⁻¹ y actividades metanogénicas específicas del orden de 500 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ y de 100 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ con etanol y 1-etoxi-2-propanol como sustratos, respectivamente. La mayor velocidad ascensional del reactor R2

propició la formación de gránulos menos resistentes a las fuerzas de cizalladura en comparación con los gránulos del reactor R1.

La estructura de las poblaciones microbianas al finalizar el estudio fue similar en ambos reactores, evidenciado un cambio respecto a las comunidades microbianas predominantes en el inóculo. En ambos reactores destacó la predominancia de bacterias del orden *Bacteroidales* y del orden *Clostridiales*, de microorganismos acetogénicos pertenecientes al género *Geobacter* y de bacterias sulfatoreductoras del género *Desulfovibrio*. Asimismo, destacó la predominancia de metanógenos hidrogenotróficos del género *Methanocorpusculum*, confirmando que la metanogénesis hidrogenotrófica desempeña un importante papel en la conversión de la mezcla de disolventes orgánicos de interés a metano.

Se ha realizado un estudio comparativo de la estructura de las comunidades microbianas del fango desarrollado en los experimentos en los que se utilizó quitosano como coadyuvante del proceso de granulación. Los resultados muestran que en todos los fangos granulares analizados se obtuvo una estructura de las comunidades microbianas similar, con predominancia de bacterias pertenecientes a los géneros *Geobacter* y *Desulfovibrio* y arqueas metanogénicas del género *Methanocorpusculum*.

8 ESTUDIO DE LA PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR UASB ALIMENTADO CON UN AGUA RESIDUAL CONTAMINADA CON DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE ESFERAS DE ALCOHOL POLIVINÍLICO

La presencia de partículas inertes o bioportadores para la adhesión de los microorganismos es uno de los factores que contribuye a la formación de biomasa granular a partir de un fango en suspensión (Hulshoff Pol et al., 2004; Teo et al., 2000). Estas partículas actúan como núcleos inertes sobre cuya superficie los microorganismos pueden adherirse, iniciando así la formación de biopelículas que, posteriormente, se convierten en gránulos debido al crecimiento de los microorganismos adheridos (Hulshoff Pol et al., 2004; Lettinga et al., 1980). En diversos estudios se ha investigado el efecto de diferentes materiales para acelerar la granulación de fangos anaerobios y, por tanto, la puesta en marcha de reactores de alta carga. Entre los materiales que se reportan en la bibliografía se encuentran las esferas de gel de alcohol polivinílico (PVA). Este material ha demostrado promover la formación de gránulos en virtud de su microestructura porosa — apropiada para la retención de microorganismos— y de su adecuada gravedad específica. Wenjie et al. (2008) encontraron que, en comparación con otros materiales inertes como el carbón activado o la arena, las esferas de PVA tienen una densidad similar a la de los gránulos formados de manera natural, $1.03\text{--}1.08\text{ g mL}^{-1}$ (Schmidt y Ahring, 1996), lo cual podría favorecer la adhesión microbiana al propiciar el contacto entre el material de soporte y los microorganismos.

En este capítulo se presenta el estudio de la puesta en marcha de un reactor anaerobio empleado para el tratamiento de un agua residual sintética contaminada con etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, los disolventes orgánicos de interés durante el desarrollo de esta tesis doctoral, en presencia de esferas de PVA. El estudio tiene como objetivo evaluar la puesta en marcha del reactor a partir de un fango anaerobio en suspensión, utilizando esferas de PVA como portadores de biomasa para la formación de biomasa granular.

El estudio se realizó en un reactor UASB operado a temperatura ambiente y bajo condiciones de alimentación continua del agua residual sintética contaminada con etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol (relación másica 7:2:1), con el objetivo de alcanzar una operación estable tratando al menos una carga orgánica volumétrica de $15\text{ kg DQO m}^{-3}\text{ d}^{-1}$. La puesta en marcha se llevó a cabo en tres fases operacionales. Al iniciar la primera fase de operación (Fase I), el reactor UASB se inoculó con el fango en suspensión y con las esferas de PVA, previamente elaboradas de acuerdo con el método descrito en el apartado 4.7 de Materiales y Métodos. En esta fase se aplicaron cargas orgánicas volumétricas bajas a fin de conseguir la adaptación del inóculo a los disolventes orgánicos, tal como se realizó en los estudios previos de esta tesis doctoral. En la siguiente fase de operación, Fase

II, se aplicaron cargas orgánicas volumétricas mayores y se realizó una segunda adición de esferas de PVA que se diferenciaron de las primeras en su método de elaboración. En la tercera fase, Fase III, se efectuó el aumento de la carga orgánica hasta alcanzar condiciones de operación estables a $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

8.1 PLAN DE TRABAJO

En los siguientes apartados se describe el plan de trabajo realizado para evaluar la

puesta en marcha del reactor UASB en el tratamiento en continuo de un agua residual contaminada con disolventes orgánicos en presencia de esferas de PVA.

8.1.1 Puesta en marcha y operación del reactor UASB

Al inicio del estudio se elaboraron las esferas de PVA y se evaluó la actividad metanogénica específica del inóculo a fin de determinar la carga orgánica inicial para la puesta en marcha del reactor. El estudio se realizó a temperatura ambiente y bajo condiciones de alimentación continua del agua residual sintética contaminada con los disolventes orgánicos. En la Tabla 8.1 se presentan las condiciones de operación que se establecieron durante las diferentes fases del estudio.

Tabla 8.1. Condiciones de operación durante la puesta en marcha del reactor UASB en presencia de esferas de PVA.

	Fase I	Fase II	Fase III
Tiempo (días)	(0 - 37)	(38 - 83)	(84 - 100)
CO ($\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)	0.6 - 3.5	4.0 - 10	15.0
C_e (g DQO L^{-1})	1.7 - 4.4	5.0	6.3
TRH (d)	3.0 - 1.3	1.3 - 0.5	0.42
V_a (m h^{-1})	0.03 - 0.08	0.08 - 0.2	0.24
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	21.3 ± 3.2	22.6 ± 2.2	22.6 ± 1.2

El experimento se realizó con la configuración de reactor de 7.8 L de volumen efectivo que se muestra en la Figura 4.1 sin corriente de recirculación. El inóculo empleado fue el fango en suspensión, denominado Inóculo II, procedente del

digestor anaerobio de la estación depuradora de aguas residuales de Quart-Benager. Las características fisicoquímicas de este fango anaerobio se muestran en la Tabla 4.1 del capítulo de Materiales y Métodos. La inoculación del reactor se llevó a cabo con 2.5 L del fango anaerobio y con 1 L de las esferas de PVA. La estrategia empleada para la puesta en marcha y para acelerar la formación de biomasa granular consistió en la aplicación de cargas orgánicas crecientes mediante el aumento de la concentración de disolventes orgánicos en la corriente de entrada del reactor y/o el aumento del caudal de agua contaminada. En la primera fase de operación (Fase I, días 0-37) se aplicaron cargas orgánicas entre 0.6 y 3.5 kg DQO m⁻³ d⁻¹, y el tiempo de retención hidráulico se redujo desde un valor inicial de 3 días hasta 1.3 días. En esta primera fase, que corresponde a la fase de adaptación al sustrato orgánico, la carga orgánica se incrementó en el momento en que se alcanzaron eficacias de eliminación superiores al 70 % verificando que no se produjera un lavado de biomasa en el efluente del reactor perjudicial para el proceso de tratamiento. En la segunda fase de operación (Fase II, días 38-83) la carga orgánica se incrementó entre 4 y 10 kg DQO m⁻³ d⁻¹ y se añadió un segundo volumen de esferas de PVA de 0.6 L a la vista de los resultados en cuanto a la formación de biomasa granular. En la siguiente fase (Fase III, días 84-100), la carga orgánica se incrementó hasta el valor establecido de 15 kg DQO m⁻³ d⁻¹. El incremento de la carga orgánica durante las fases de operación II y III se efectuó al alcanzar eficacias de eliminación superiores al 85 % con variaciones de menos del 5 % durante al menos tres veces el tiempo de retención hidráulico aplicado. Durante la realización del experimento, la concentración de disolvente orgánicos en la corriente de entrada del reactor varió en el intervalo comprendido entre 1.7 y 6.3 g DQO L⁻¹.

8.1.2 Evaluación de las características fisicoquímicas del fango anaerobio

La granulación en presencia de esferas de PVA, actuando como bioportadores para la formación de biomasa granular, se evaluó atendiendo a la variación temporal de las características fisicoquímicas del fango anaerobio. Para ello se tomaron muestras del reactor en los días 0, 30, 62, 83 y 100 y se determinó la distribución de tamaño de partícula. Al finalizar el estudio, se determinó el coeficiente de integridad, la velocidad de sedimentación, la actividad metanogénica específica, el potencial bioquímico de metano y la morfología de los gránulos formados.

Los ensayos para estimar la actividad metanogénica específica y el potencial bioquímico de metano se efectuaron utilizando como sustrato orgánico la mezcla

ternaria de disolventes compuesta por etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol (relación másica 7:2:1), y con cada componente de la mezcla como fuente única de sustrato orgánico. La concentración de sustrato se estableció en 3.0 g DQO L⁻¹ y la relación inóculo sustrato en 2.1 g SSV g DQO⁻¹. Los ensayos se realizaron por triplicado a 25 °C.

8.1.3 Análisis de las comunidades microbianas

El análisis de las comunidades microbianas y su variación temporal se llevó a cabo mediante la técnica de DGGE. Las muestras objeto de estudio corresponden al inóculo y a aquéllas tomadas del reactor en los días 36, 50, 64 y 100.

8.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.2.1 Operación del reactor UASB

En este apartado se detallan los resultados obtenidos relativos al rendimiento y a la estabilidad del reactor UASB durante el experimento. En la Tabla 8.2 se presentan los resultados promedio correspondientes a cada fase operacional. De los valores obtenidos destaca la menor eficacia de eliminación obtenida durante la Fase I en comparación con las siguientes fases. Como en los otros estudios que componen esta tesis doctoral, en los que se ha evaluado la puesta en marcha de reactores anaerobios con un fango en suspensión no adaptado a la degradación de disolventes orgánicos, la menor eficacia de eliminación obtenida en la Fase I y su variabilidad evidencian la necesidad de un periodo de adaptación para la degradación del sustrato alimentado. Durante la Fase II fue necesario aumentar el suministro de bicarbonato desde un valor de 4 g NaHCO₃ L⁻¹ a 4.5 g NaHCO₃ L⁻¹ a fin de mantener el pH en valores próximos a la neutralidad al aumentar la carga de disolventes en esta fase de operación. El aumento en la alcalinidad resultó en una mayor conductividad en esta fase.

Tabla 8.2. Resultados experimentales obtenidos en las fases operacionales del estudio.

Tiempo (días)	Fase I (0 - 37)	Fase II (38 - 83)	Fase III (84 - 100)
CO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	0.6 - 3.5	4.0 - 10	15.0
EE (%)	60 ± 29	86 ± 7	83 ± 7
CO _{E2P} (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	0.06 - 0.37	0.42 - 1.06	1.58
EE _{E2P} (%)	59 ± 11	73 ± 5	64 ± 7
Producción de CH ₄ (L CH ₄ d ⁻¹)	3.7 ± 1.8	14.6 ± 6.1	28.3 ± 2.3
Y CH ₄ (Nm ³ CH ₄ kg DQO ⁻¹ _{degradada})	0.280 ± 0.064	0.330 ± 0.056	0.295 ± 0.024
pH	7.7 ± 0.3	7.5 ± 0.2	7.4 ± 0.3
Conductividad (mS cm ⁻¹)	5.5 ± 0.8	5.8 ± 0.5	5.5 ± 0.6
Alcalinidad (g CaCO ₃ L ⁻¹)	2.4 ± 0.6	2.7 ± 0.3	2.4 ± 0.5

Y CH₄: rendimiento de metano.

En la Figura 8.1 se muestra la variación temporal de la carga orgánica volumétrica aplicada al reactor, de la eficacia de eliminación de la materia orgánica y de la concentración de ácidos grasos volátiles. El primer día de operación se observó una eficacia de eliminación baja (15 %), pese a que el único disolvente detectado en el efluente del reactor fue el 1-etoxi-2-propanol, y a que la concentración de ácidos grasos fue inferior a 50 mg L⁻¹. En el día de operación 3 se observaron también resultados similares. Los análisis de la DQO y del carbono orgánico total soluble del efluente del reactor en este día indicaron una concentración de materia orgánica superior a la alimentada: 2.4 g DQO L⁻¹ y 0.7 g C L⁻¹ en el efluente respecto a 2.3 g DQO L⁻¹ y 0.6 g C L⁻¹ en la corriente de entrada al reactor. Los resultados obtenidos se asociaron a la desintegración de algunas esferas de PVA débilmente formadas, cuyo contenido orgánico pudo contribuir a la concentración de materia orgánica en el efluente del reactor, afectando a la estimación de su rendimiento. Posteriormente, operando a una carga orgánica de 1.1 kg DQO m⁻³ d⁻¹ en el día 7, se obtuvo una eficacia de eliminación del 70 %. También en este caso el único disolvente orgánico detectado en el efluente fue el 1-etoxi-2-propanol, representando sólo un 20 % de la concentración de la materia orgánica soluble del efluente; en este día no se detectaron ácidos grasos volátiles (Figura 8.2b). Estos resultados sugieren que los productos asociados a la desintegración de las esferas de gel de PVA: PVA y alginato, pudieron estar presentes en el efluente. Sin embargo, las concentraciones observadas fueron inferiores a la del día 3, bien debido al lavado del material desintegrado, o bien debido a la degradación del mismo. En el caso del PVA, Kawai y Hu (2009) señalaron que en condiciones anaerobias la degradación de

este compuesto ocurre de manera lenta y está influenciada por su peso molecular. Matsumura et al. (1993) realizaron ensayos en reactores en discontinuo para determinar la biodegradabilidad de PVA con pesos moleculares de 2000 y 14000 utilizando un fango anaerobio de una estación depuradora de aguas residuales y sedimentos anaerobios de un río. Estos autores reportaron eficacias de eliminación del carbono orgánico total superiores al 60 % tras 40 días en el caso del PVA de peso molecular de 2000, y 150 días para el PVA de peso molecular de 14000. La degradación anaerobia del alginato, un polisacárido lineal que contiene ácidos carboxílicos, puede ser llevada a cabo por microorganismos anaerobios facultativos (Kita et al., 2015).

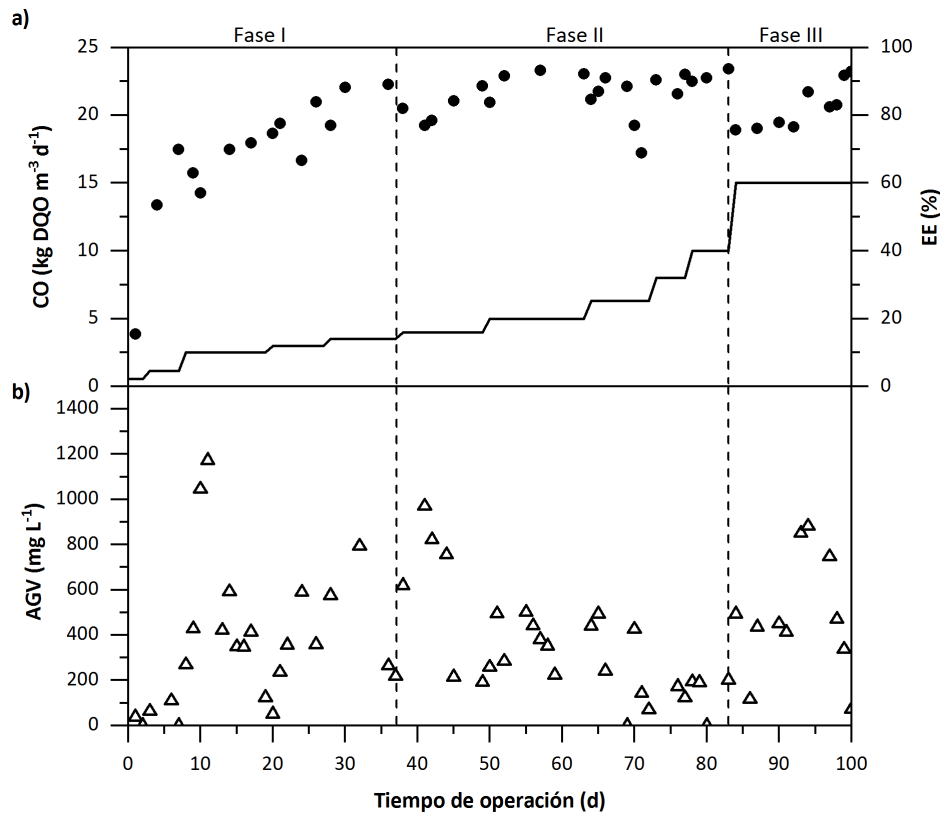


Figura 8.1. Variación temporal de: a) la carga orgánica volumétrica (—) y la eficacia de eliminación (●), y b) la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente del reactor UASB (Δ).

La carga orgánica se incrementó en el día 8 a un valor de $2.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, ocasionando el descenso de la eficacia de eliminación hasta el 57 %. Este descenso en la eficacia de eliminación estuvo asociado a la acumulación de ácidos grasos volátiles, con una concentración en torno a 1200 mg L^{-1} , tal como se observa en la Figura 8.1b. No obstante, tras 11 días operando a esta carga, la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente disminuyó hasta 124 mg L^{-1} y se observó el aumento concomitante de la eficacia de eliminación hasta el 71 %. Al finalizar el período de adaptación, con una carga orgánica de $3.5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, se obtuvo una eficacia de eliminación del 89 % y una concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente de 217 mg L^{-1} . Las altas concentraciones de ácidos grasos volátiles observadas durante la Fase I indican el desequilibrio entre la cinética del consumo de sustrato por parte de los microorganismos acetogénicos y la conversión a metano por parte de los metanógenos. Dicho desequilibrio pudo estar ocasionado por el rápido incremento de la carga orgánica que se efectuó durante esta fase. No obstante, se observó el aumento gradual de la eficacia de eliminación, reflejando la adaptación de los microorganismos a la degradación del sustrato orgánico.

Cabe señalar, además, que durante la Fase I se registraron temperaturas de operación inferiores a $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ entre el día 16 y el día 27. Atendiendo a la sensibilidad de los metanógenos a los cambios de temperatura y a su baja velocidad de crecimiento en el intervalo psicrófilico, las bajas temperaturas de operación en el periodo indicado pudieron afectar al proceso de degradación derivando en una mayor inestabilidad.

Durante la Fase II, que inició en el día 38, se obtuvieron eficacias de eliminación superiores a las observadas en la Fase I. El aumento de la carga orgánica en esta fase ocasionó un descenso de la eficacia de eliminación para cada carga orgánica aplicada, relacionado con la diferencia entre las velocidades de producción y de consumo de los ácidos grasos volátiles (Figura 8.1). No obstante, para cada incremento aplicado se obtuvieron eficacias de eliminación finales superiores al 85 %. A la vista de los resultados obtenidos de formación de biomasa granular que se presentan en la sección 8.2.2, en el día 70 se añadió al reactor un volumen de 0.6 L de esferas de PVA. Para la formación de estas esferas se empleó, además de una solución saturada de ácido bórico y cloruro de calcio, una solución de sulfato de sodio como agente de gelificación para reforzar su estructura siguiendo las indicaciones de Takei et al. (2011). Pese al cambio de método para la elaboración de las esferas se observó de nuevo un descenso en la eficacia de eliminación, desde el 88 % en el día 69 hasta el 60 % en el día 71, probablemente debido a la presencia

de PVA y/o alginato en el seno del reactor. A partir de este momento la recuperación del reactor fue rápida y, en el día 83, al finalizar esta fase de operación, la eficacia de eliminación fue del 94 % operando a una carga orgánica de $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, con concentraciones de ácidos grasos volátiles en el efluente inferiores a 200 mg L^{-1} que indicaron una mayor capacidad de tratamiento del agua residual sintética alimentada.

Al iniciar la Fase III, en el día 84, se incrementó la carga orgánica hasta el valor de $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, resultando en la disminución de la eficacia de eliminación hasta un 75 % y en el aumento de la concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente con valores que oscilaron entre 493 y 881 mg L^{-1} durante los primeros 10 días de esta fase. Posteriormente, de manera progresiva, la eficacia de eliminación aumentó hasta alcanzar valores superiores al 90 % con una concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente de 72 mg L^{-1} al finalizar el experimento en el día 100.

La concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente del sistema se mantuvo en valores relativamente altos durante las tres fases de operación ($370 \pm 276 \text{ mg L}^{-1}$). No obstante, el reactor alcanzó la carga orgánica de $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ con altas eficacias de eliminación en un periodo de aproximadamente 3 meses, periodo relativamente corto considerando que el periodo de puesta en marcha de reactores UASB que se indica en la bibliografía puede variar entre 2 y 8 meses (Liu et al., 2003). El tiempo requerido para la puesta en marcha varía en función de las características del inóculo, la composición del agua residual a tratar y las condiciones de operación del reactor, y está relacionado con el tiempo que requiere el sistema para el desarrollo de la biomasa granular que permita la aplicación de la carga orgánica de interés (Ghangrekar et al., 1996; Liu et al., 2003; Tiwari et al., 2006). Show et al. (2004) reportaron un periodo similar de 115 días para alcanzar una carga orgánica de $16 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ durante la puesta en marcha de un reactor UASB que trataba un agua residual sintética contaminada con glucosa. Por su parte, Oktem et al. (2007) reportaron un periodo de puesta en marcha de 97 días para el tratamiento de un agua residual procedente de una industria farmacéutica compuesta por acetato de n-butilo, dimetil formamida, isopropanol, acetato de etilo y cloruro de metileno en un reactor UASB híbrido, aplicando una carga orgánica de $3 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Sudmalis et al. (2018) consiguieron la operación estable de reactores UASB que trataban un agua residual compuesta por glucosa, acetato, triptona y altas concentraciones de sodio ($5\text{-}20 \text{ mg Na}^+ \text{ L}^{-1}$) en tan sólo tres semanas, operando a cargas orgánicas bajas de 1 a $1.4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, y en 100 días, operando a una carga orgánica máxima de $16 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

La Figura 8.2 muestra la producción y el rendimiento de metano para cada carga orgánica aplicada durante las diferentes fases del estudio. En dicha figura se puede observar que la producción de metano aumentó de acuerdo con el incremento en la carga orgánica. En la primera fase de operación el rendimiento de metano, estimado a partir de la degradación de la materia orgánica suministrada en el alimento, varió en el intervalo comprendido entre 0.172 y $0.402 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$. El máximo valor se obtuvo en el día 10, donde la producción fue superior al valor estequiométrico, un hecho que podría asociarse con la presencia de materia orgánica procedente de la desintegración de las esferas en el efluente del reactor. En la Fase II se obtuvieron valores más próximos al estequiométrico, con un valor promedio de $0.330 \pm 0.056 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$, aunque en el día 71 se observó un coeficiente de rendimiento de $0.490 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$. Este rendimiento inusualmente alto puede atribuirse al incremento de la materia orgánica en el efluente como producto de la adición de las nuevas esferas de PVA (Figura 8.1a), y a su degradación, resultando en un aumento de la producción de metano, que en este día fue de 16.8 NL d^{-1} . Este valor excede la producción diaria promedio de $12.2 \pm 0.3 \text{ NL d}^{-1}$ observada con anterioridad a la adición de las esferas, y sugiere que los microorganismos presentes en el reactor podrían haber efectuado la degradación de una fracción del PVA-alginato disponible en el medio, lo cual muestra a su vez la adaptación de dichos microorganismos a la degradación de estos sustratos. Posteriormente, el rendimiento de metano se mantuvo en los valores habituales cercanos a $0.32 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$. En la última fase el rendimiento de metano descendió a un valor de $0.295 \pm 0.025 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ debido al aumento de la carga orgánica hasta $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

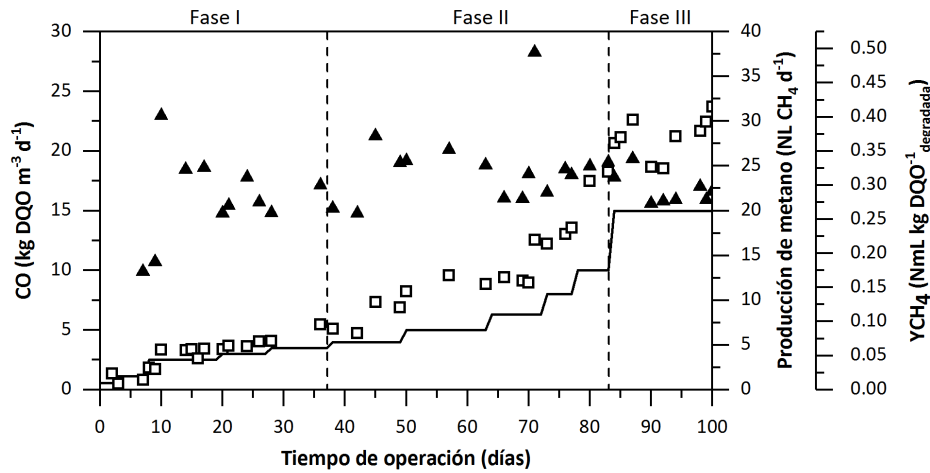


Figura 8.2. Carga orgánica aplicada (—), producción de metano (□) y rendimiento de metano durante las diferentes fases del estudio (▲)².

En la Figura 8.3 se ilustra la producción de metano en función de la carga orgánica degradada en el reactor, considerando los valores obtenidos al alcanzar eficacias de eliminación estables para cada incremento de la carga orgánica aplicada. La producción de metano aumentó (coeficiente R^2 de 0.9924) al aumentar la carga orgánica, con un rendimiento de $0.304 \pm 0.006 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1} \text{ degradada}$. El rendimiento de metano obtenido se encuentra en el intervalo reportado en la bibliografía para el tratamiento de aguas residuales que contienen disolventes orgánicos (Bravo et al., 2017; Enright et al., 2009; Ferrero et al., 2018; Lafita et al., 2015), y es similar al rendimiento obtenido para los reactores que se estudiaron en el Capítulo 5. El contenido de metano en el biogás varió entre el 71 y el 75 % durante las tres fases de operación.

²Los rendimientos de metano estimados durante los primeros 6 días del estudio no se consideraron para la realización del gráfico debido al aumento de la materia orgánica en el efluente como consecuencia de la desintegración de las esferas de PVA.

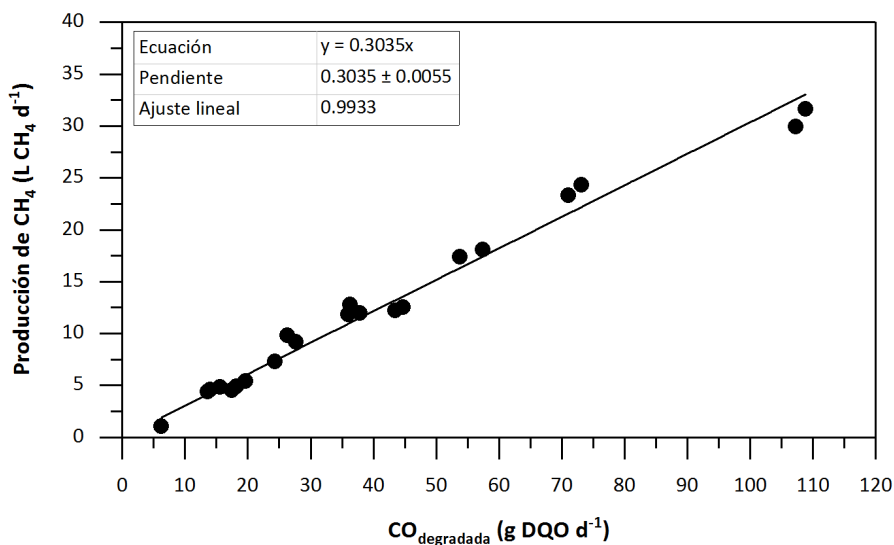


Figura 8.3. Producción de metano en función de la carga orgánica degradada en el reactor UASB.

Durante este estudio se evaluó la composición del efluente del reactor con el propósito de determinar la eficacia de degradación de los disolventes alimentados. De nuevo, los disolventes etanol y acetato de etilo se eliminaron con eficacias de eliminación superiores al 99 % en todas las fases del estudio. La eficacia de degradación del 1-etoxi-2-propanol fue inferior. En la Figura 8.4 se muestran la variación temporal de la carga orgánica de 1-etoxi-2-propanol aplicada (g DQO d⁻¹), la concentración de 1-etoxi-2-propanol en el afluente del reactor y su eficacia de eliminación. La eficacia de eliminación inicial presentó un valor de sólo el 38 %, y aumentó de manera progresiva pese al aumento de la carga orgánica de entrada hasta alcanzar un valor máximo del 72 % en el día 26. La concentración de 1-etoxi-2-propanol en el efluente del reactor se mantuvo relativamente estable en un valor de 126 ± 19 mg L⁻¹, excepto en el periodo comprendido entre los días 28 y 37, cuando el aumento en la carga ocasionó el descenso de la eficacia de eliminación hasta un valor del 54 %. En la Fase II, la concentración en el efluente del reactor osciló entre 98 y 211 mg L⁻¹ debido al aumento de la carga de 1-etoxi-2-propanol; no obstante, respecto a la Fase I, la eficacia de eliminación aumentó a un valor del 73 ± 4 %, indicando una mayor capacidad de eliminación de este disolvente orgánico. En la Fase III, el aumento de la carga orgánica condujo a la acumulación de 1-etoxi-2-propanol en el efluente con concentraciones de hasta 280 mg L⁻¹, y con la consecuente disminución de la eficacia de eliminación hasta valores en

torno al 60 % que se mantuvieron hasta finalizar el estudio. Así, el aumento de la carga desde 8.2 hasta 12.4 g DQO d⁻¹ afectó a la actividad de los microorganismos capaces de llevar a cabo la degradación de este compuesto.

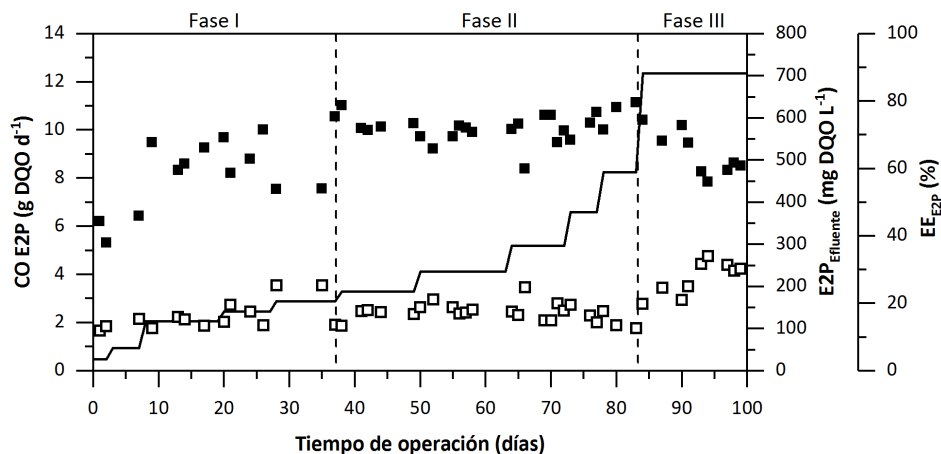


Figura 8.4. Variación temporal de la carga orgánica de 1-etoxi-2-propanol aplicada (—), concentración de 1-etoxi-2-propanol en el efluente (□) y eficacia de eliminación durante las diferentes fases del estudio (■).

En la Figura 8.5 se muestra la variación temporal de la concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente del reactor. El lavado de biomasa disminuyó desde un valor de 320 mg SSV L⁻¹ al iniciar la Fase I, hasta valores próximos a 100 mg L⁻¹ a partir del día 10 y hasta finalizar el experimento; con excepción del día 71 en el que se observó una elevada concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente del reactor como resultado de la desintegración de las esferas de PVA y del incremento en la producción de biogás.

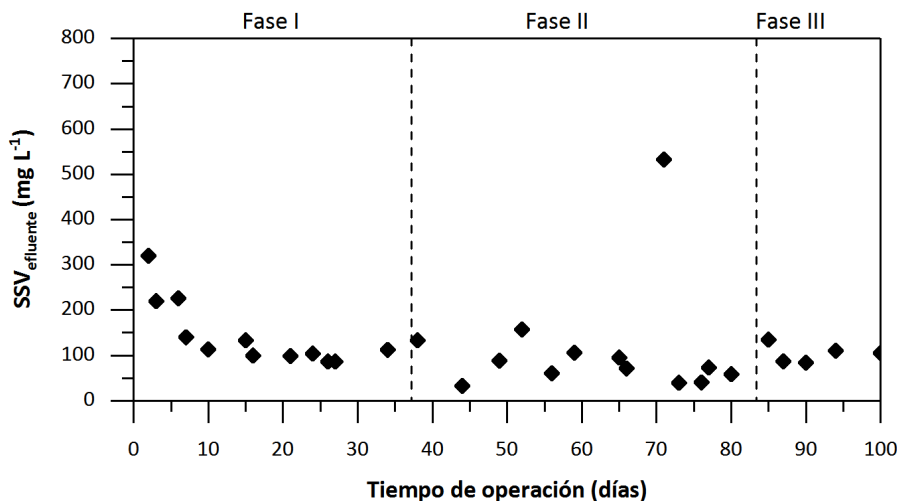


Figura 8.5. Variación temporal de la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el efluente del reactor.

Los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento del sistema indican una evolución satisfactoria de la eficacia de eliminación de la materia orgánica alimentada, con una producción de metano cercana al valor estequiométrico y una pérdida de sólidos estable. A pesar de las condiciones estresantes a las que operó el reactor UASB, se consiguió la puesta en marcha del sistema a partir de un fango anaerobio en suspensión, alcanzando la carga orgánica de $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ establecida con eficacias de eliminación superiores al 90 %.

8.2.2 Formación de biomasa granular en presencia de esferas de PVA

Como se ha mencionado previamente, durante la realización del estudio se observó la desintegración de las esferas de PVA. No obstante, no todo el material adicionado se desintegró; se observaron esferas de PVA en el efluente, en la parte superior del reactor flotando y otras en la zona del manto de lodos, entre el lecho de reacción y el separador GLS. Tras la segunda adición de esferas, fabricadas con Na_2SO_4 para reforzar su estructura, se observó el mismo fenómeno de desintegración.

En la Figura 8.6 se muestra una imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido realizada a las esferas de PVA. A diferencia de una superficie porosa que

podiera propiciar la adhesión de los microorganismos, la superficie de las esferas de PVA fabricadas inicialmente presentó un aspecto bastante liso. Las esferas obtenidas con Na_2SO_4 presentaron una superficie diferente semejante a una matriz de sustancias poliméricas; aun así, dista de la morfología reticular que se ha reportado en la bibliografía para esferas de gel de PVA-alginato obtenidas en condiciones similares (Takei et al., 2011) o de adquisición comercial (Chaikasem, 2015; Jin et al., 2016; Wenjie et al., 2008). La desintegración de las esferas de PVA estaría asociada a una gelificación inestable que propició la pérdida del PVA de aquéllas esferas inicialmente formadas.

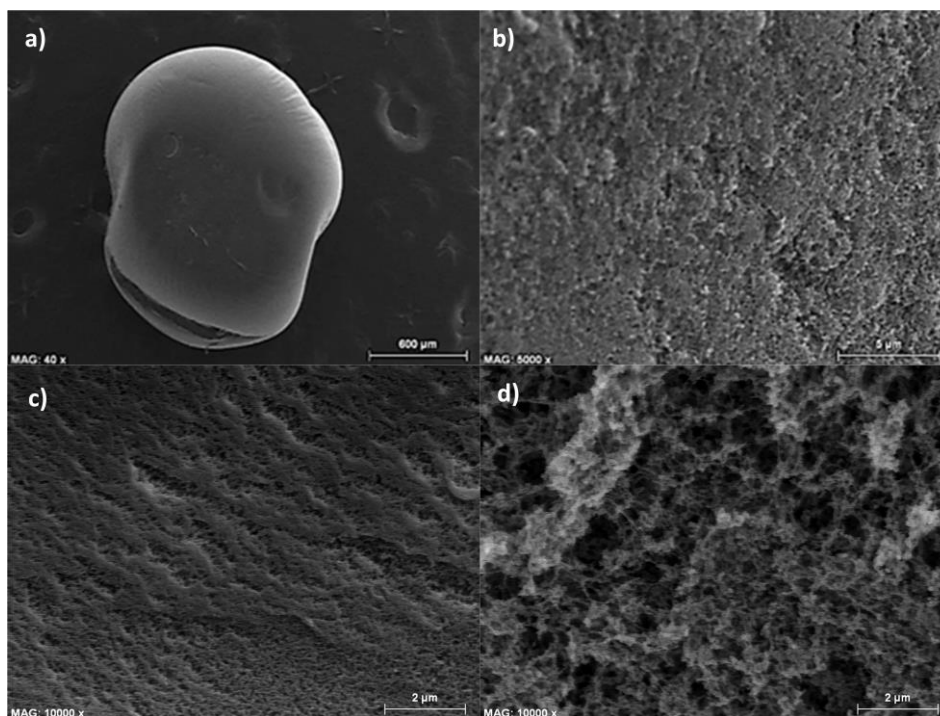


Figura 8.6. Microscopía electrónica de barrido de la morfología de las esferas de PVA: a) Esferas de PVA al iniciar el experimento, b) Magnificación de la superficie de las esferas al iniciar el experimento (5000x), c) Magnificación de la superficie de las esferas al iniciar el experimento (10000x) y d) Magnificación de las esferas de PVA elaboradas con Na_2SO_4 (10000x).

Con el propósito de evaluar el efecto de las condiciones operacionales establecidas sobre la formación de biomasa granular, así como una posible influencia del PVA-alginato en dicha formación, se evaluaron las características del

fango anaerobio. Durante el estudio se determinó la variación temporal del tamaño de partícula y, al finalizar éste, se evaluaron otras características del fango como la velocidad de sedimentación, la resistencia de los gránulos y la actividad metanogénica específica. En esta sección se detallan los resultados obtenidos.

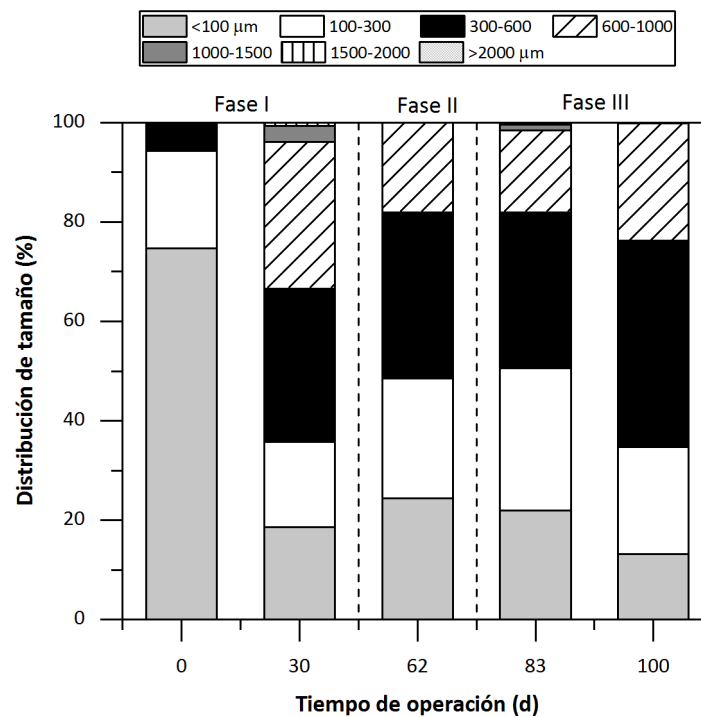
Evolución del tamaño de partícula

En la Tabla 8.3 se presenta la distribución de tamaño de partícula de las muestras de biomasa extraídas del reactor UASB en el transcurso del estudio. Los resultados también se presentan en la Figura 8.7 facilitando la visualización. La distribución de tamaño de partícula de la muestra correspondiente al inóculo evidencia su naturaleza dispersa o en suspensión, con un porcentaje de partículas con un tamaño inferior a 100 μm del 74.7 % y un diámetro medio de partícula de 85 μm . Tras 30 días de operación, el diámetro medio de partícula aumentó considerablemente hasta un valor de 441 μm , y el porcentaje de gránulos (partículas con un tamaño $>300 \mu\text{m}$) fue del 64.3 %. El aumento del tamaño de partícula, además de corresponder a la formación natural de gránulos, también podría relacionarse con la presencia de esferas de PVA. No obstante, la ausencia de partículas con un tamaño superior a 2000 μm , pese a que el 80 % de las esferas elaboradas presentaban un tamaño superior a éste valor al iniciar el experimento, indica la desintegración de las mismas. En la muestra correspondiente al día 62 el porcentaje de gránulos y el diámetro medio de partícula descendieron debido al lavado o a la desintegración de esferas de PVA, tal como se deduce de la desaparición de partículas con un tamaño superior a 1100 μm , que alcanzaba un valor del 3.9 % en la muestra anterior. Los valores obtenidos al final de la Fase II muestran que la adición de las nuevas esferas de PVA en el día 70 no influyó significativamente en la distribución de tamaño de partícula, como se podría intuir, tras los resultados obtenidos del rendimiento del reactor que indicaron una desintegración de las esferas: pérdida de biomasa, aumento de la concentración de materia orgánica en el efluente y una producción de metano superior al valor estequiométrico.

Tabla 8.3. Distribución de tamaño de partícula (%) de las muestras de biomasa tomadas en el transcurso del estudio.

% (μm)	Fase I		Fase II		Fase III
	0	30	62	83	100
<100	74.7	18.6	24.4	22.0	13.2
100-300	19.6	17.1	24.2	28.6	21.5
300-600	5.5	30.8	33.4	31.3	41.5
600-1000	0.2	29.5	18.1	16.6	23.6
1000-1500	0.0	3.3	0.0	1.1	0.2
1500-2000	0.0	0.6	0.0	0.4	0.0
>2000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
> 300	5.7	64.3	51.5	49.5	65.3
ϕ (μm)	85	441	317	330	387

ϕ : diámetro medio de partícula.

**Figura 8.7.** Variación temporal de la distribución de tamaño de partícula.

Al finalizar el estudio (día 100) se observó el aumento en el tamaño medio de partícula hasta un valor de $387 \mu\text{m}$ y el aumento del porcentaje de gránulos, alcanzado un valor del 65.3 %. En la Figura 8.8 se muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de los gránulos formados en el reactor UASB. Los gránulos presentaron una estructura rígida con una superficie regular y densa (Figura 8.8a), con una comunidad microbiana heterogénea compuesta por microorganismos con morfología de filamentos, cocos y bacilos (Figura 8.8b).

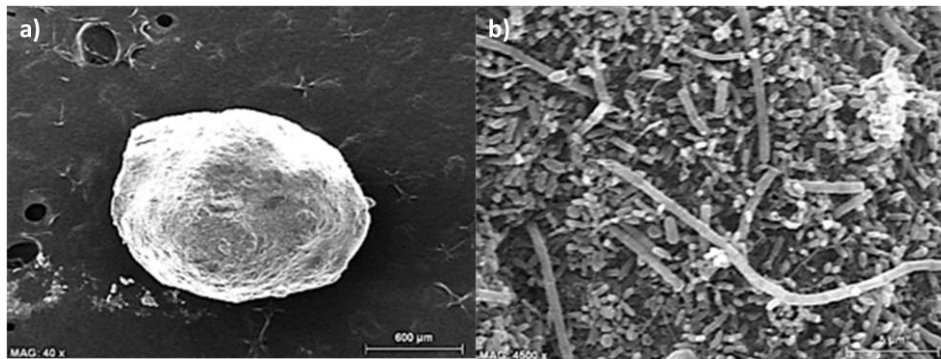


Figura 8.8. Microscopía electrónica de barrido de la morfología de los gránulos al finalizar el estudio: a) Superficie de los gránulos y b) Magnificación de los gránulos (4500x).

En contraste con los resultados obtenidos en este estudio, Wenjie et al. (2008) reportaron la mejora del proceso de granulación en un reactor UASB que trataba un agua residual sintética compuesta por licor de maíz al usar esferas de PVA como portadores de biomasa. Aproximadamente el 80 % de las esferas que se añadieron al inocular el reactor sirvieron como núcleos para la formación de gránulos, los cuales exhibieron una velocidad de sedimentación de 200 m h^{-1} y una cantidad de biomasa adherida de $0.93 \text{ g SSV g PVA}^{-1}$; mientras que la formación natural de agregados no se alcanzó con éxito. Jin et al. (2016) obtuvieron resultados similares durante el tratamiento de un agua residual contaminada con etilenglicol en un reactor EGSB inoculado con esferas de PVA, alcanzando una cantidad de biomasa adherida a las esferas de $0.83 \text{ g SSV g PVA}^{-1}$. En ambos estudios se usaron esferas de PVA de adquisición comercial.

Si bien es cierto que, debido a los aspectos anteriormente indicados no se puede determinar si las esferas que permanecieron en el sistema intervinieron directamente en la formación de gránulos actuando como bioportadores de biomasa, el hecho de que éstas permanecieran fluidizadas en el manto de lodos

sugiere una menor posibilidad de contacto con la biomasa, un aspecto fundamental para propiciar la adhesión de los microorganismos a cualquier tipo de partícula de naturaleza orgánica o inorgánica que actúe como centro de nucleación o portador de biomasa (Hulshoff por et al. 2004). Sin embargo, los resultados positivos respecto a la formación de biomasa granular en un corto tiempo de operación podrían asociarse, entre otros factores, a la presencia del alginato, un polisacárido que puede favorecer la agregación entre microorganismos. De acuerdo con Sobeck and Giggins (2002), entre las EPS que los microorganismos pueden producir se encuentra un polímero extracelular similar al alginato, un polisacárido extracelular lineal que se compone de ácido manurónico y ácido glucurónico, y que, en presencia de Ca^{2+} , forma una estructura reticular con propiedades gelificantes que propicia la unión entre las células. En estudios acerca de la composición de las sustancias poliméricas extracelulares que dan lugar a la formación de gránulos aerobios, se han identificado también polisacáridos extracelulares similares al alginato que actúan como geles para la formación de gránulos (Ding et al., 2015; Y. Li et al., 2014; Lin et al., 2013; Seviour et al., 2012; Yuan et al., 2014). Y. Li et al. (2014) desarrollaron con éxito gránulos aerobios en presencia de altas concentraciones de alginato ($180 \text{ mg g SST}^{-1}$), y propusieron la gelificación como el principal mecanismo para la granulación. Por consiguiente, se podría esperar que la presencia de este polímero en el reactor, como consecuencia de la desintegración de las esferas, tuviera un efecto en la formación temprana de agregados, considerando además que el agua residual sintética se alimentaba al reactor con una concentración de $150 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$.

La biomasa granular obtenida al finalizar el experimento exhibió una velocidad de sedimentación de 30.2 m h^{-1} , similar a la obtenida para el fango granular del reactor de control en el estudio que se expuso en el capítulo 5, 26.4 m h^{-1} , y algo superior a la del ensayo de granulación con alimentación intermitente (Capítulo 7). Los valores del coeficiente de integridad (CI) de la biomasa granular fueron 75.4, 63.8 y 60.9 % después de 2 (CI_2), 3 (CI_3) y 5 (CI_5) minutos de agitación en los ensayos de resistencia, respectivamente, indicando una alta resistencia de los gránulos al esfuerzo cortante inducido. Sudmalis et al. (2018) obtuvieron un CI_2 de 60.2 % para gránulos desarrollados durante el tratamiento de un agua residual con una elevada salinidad ($5 \text{ g Na}^+ \text{ L}^{-1}$). El valor de CI_5 fue similar al obtenido para los fangos del ensayo presentado en el Capítulo 7.

Actividad metanogénica específica y potencial bioquímico de metano

Una vez finalizado el estudio se determinó la actividad metanogénica específica y el potencial bioquímico de metano del fango granular desarrollado. Para la realización de los ensayos se empleó como sustrato cada componente de la mezcla ternaria de disolventes orgánicos: etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, y la mezcla con una relación másica 7:2:1. La concentración de sustrato se estableció en 3.0 g DQO L⁻¹ y la relación inóculo sustrato en 2.1 g SSV g DQO⁻¹. Todos los ensayos se realizaron por triplicado a 25 °C.

En la Figura 8.9 se muestra el volumen acumulado de metano producido para cada sustrato evaluado. Como en el resto de ensayos realizados durante el desarrollo de esta tesis doctoral para evaluar la actividad metabólica del fango anaerobio, el 1-etoxi-2-propanol evidenció una menor biodegradabilidad respecto a los otros disolventes orgánicos, que posiblemente está relacionada con la limitación cinética de la etapa de hidrólisis para la escisión del enlace éter que da lugar a los productos intermediarios, los cuales posteriormente se convierten en metano. Fueron necesarios alrededor de 5 días para la conversión del 1-etoxi-2-propanol a metano; mientras que los otros sustratos evaluados fueron degradados casi en su totalidad en menos de 30 horas. Los datos correspondientes al potencial bioquímico de metano (PBM) y a la actividad metanogénica específica (AME) de la biomasa tras los 100 días de duración del ensayo se presentan en la Tabla 8.4.

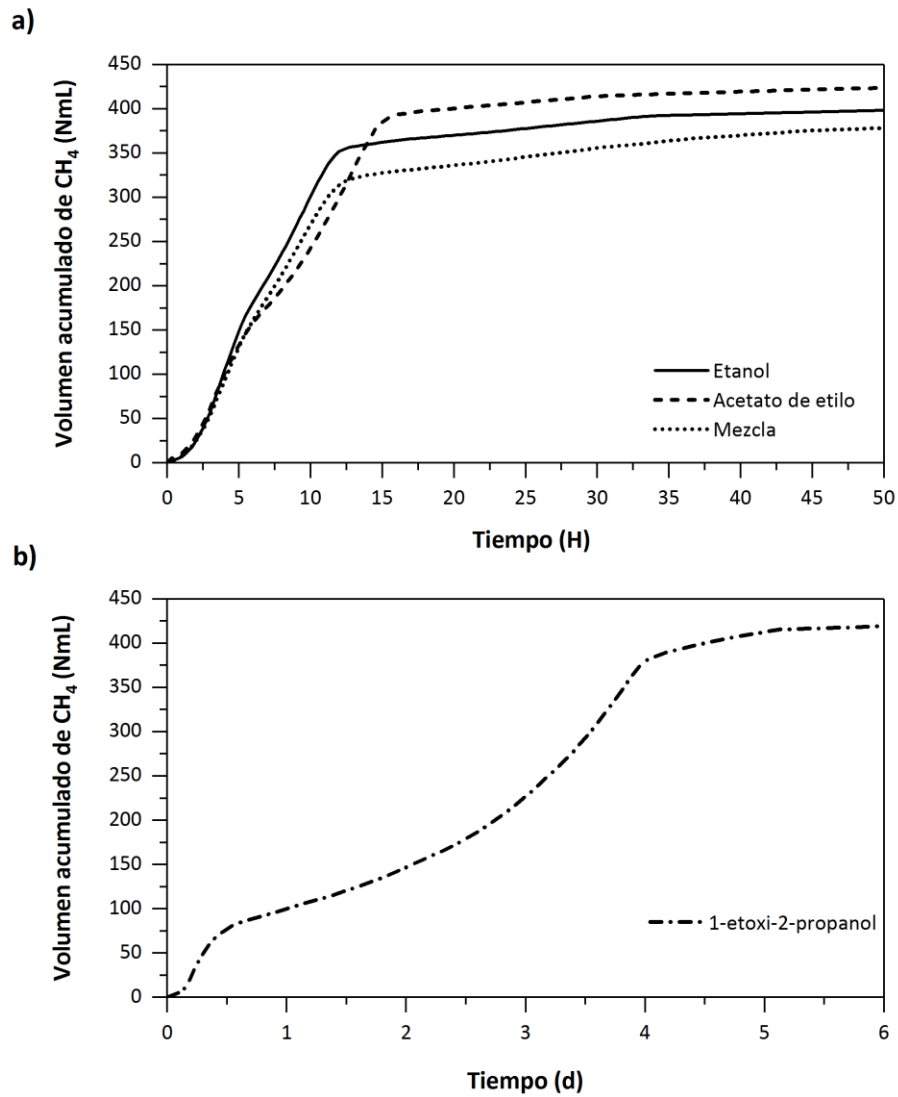


Figura 8.9. Producción de metano acumulado durante la degradación de 3.0 g DQO L^{-1} de los disolventes de interés: a) etanol, acetato de etilo y la mezcla ternaria y b) 1-etoxi-2-propanol (E2P).

Tabla 8.4. Potencial bioquímico de metano y actividad metanogénica específica de la biomasa para los distintos sustratos evaluados.

Sustrato orgánico	Etanol	Acetato de etilo	1-etoxi-2-propanol	Mezcla
PBM (NmL CH ₄ g DQO ⁻¹)	312 ± 11	333 ± 3	329 ± 98	295 ± 3
AME (NmL CH ₄ g SSV ⁻¹ d ⁻¹)	422 ± 3	345 ± 4	110 ± 5	370 ± 16
Recuperación de CH ₄ (%)	89 ± 3	95 ± 1	94 ± 2	84 ± 1
EE _{COT} (%)	96 ± 2	93 ± 1	95 ± 3	94 ± 2

EE_{COT}: eficacia de eliminación del carbono orgánico total alimentado.

La evaluación de la actividad metanogénica mostró un resultado mayor para el etanol, como era de esperar, con un valor de 422 ± 3 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹, seguido de la mezcla ternaria de disolventes con 370 ± 16 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹, el acetato de etilo con 345 ± 4 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹ y el 1-etoxi-2-propanol con un valor de 110.4 ± 5.0 NmL CH₄ g SSV⁻¹ d⁻¹. Los resultados obtenidos muestran la misma tendencia que en los ensayos anteriores.

8.2.3 Análisis de las comunidades microbianas

La variación temporal de las poblaciones microbianas durante el estudio se analizó mediante la aplicación de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) y la secuenciación del gen ARNr 16S de las bandas predominantes. En la Figura 8.10 se muestran los perfiles de DGGE de las poblaciones del dominio Bacteria (Figura 8.10a) y del dominio Arquea (Figura 8.10b) para el inóculo y para cuatro muestras de biomasa correspondientes a los días 36, 50, 64 y 100 del estudio. En dicha figura se indican las bandas predominantes aisladas del gel y posteriormente secuenciadas. En la Tabla 8.5 se presenta la identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de las bandas aisladas, el número de acceso, el porcentaje de similitud en relación con las secuencias de la base de datos GenBank y su afiliación filogenética.

A partir del gel del dominio Bacteria se aislaron 12 bandas, 5 de las cuales estaban presentes en el inóculo (Inóculo II): B1, B2, B3, B5 y B11. Cuatro de estas bandas permanecieron en las diferentes fases del estudio (B1, B2, B5 y B11) junto con las bandas restantes: B4, B6, B7 B8, B9 B10 y B12, evidenciando así el aumento en la diversidad de las poblaciones de bacterias en comparación con el inóculo. El aumento

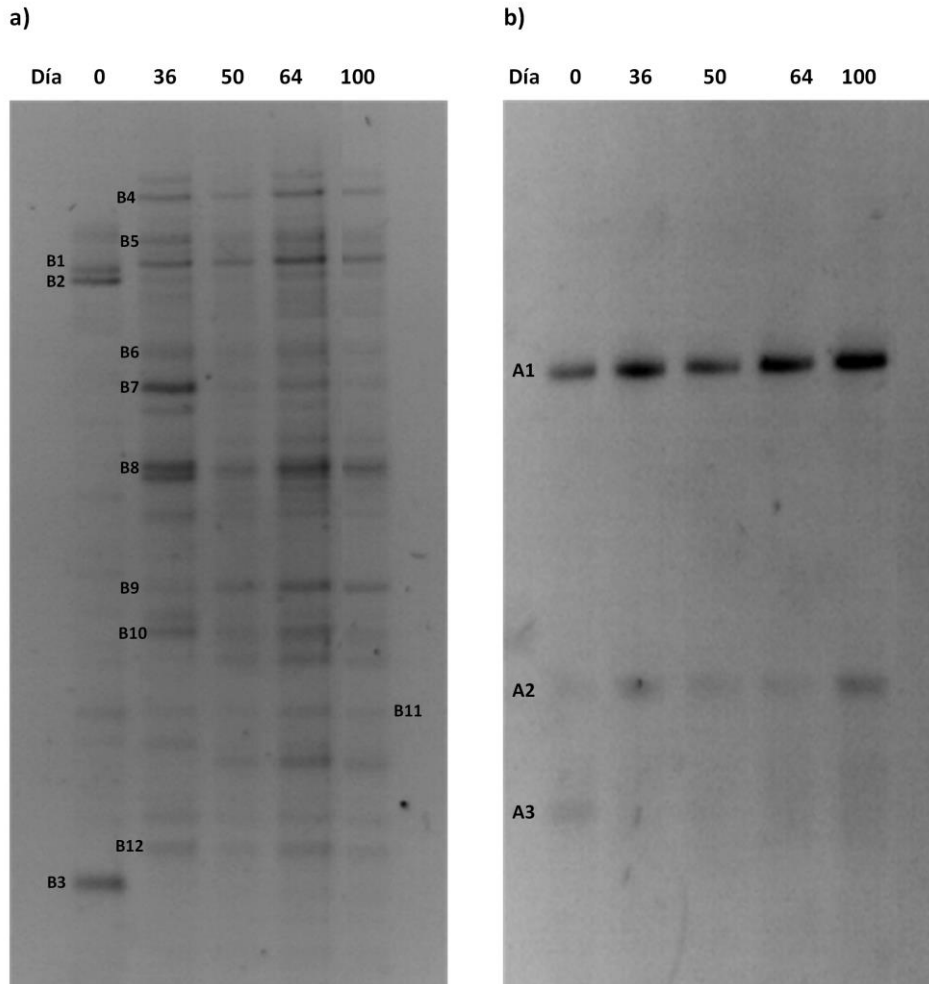


Figura 8.10. Variación temporal de los perfiles de DGGE de la biomasa tomada del reactor durante el experimento. **a)** DGGE de bacterias y **b)** DGGE de arqueas.

del número de bandas puede relacionarse con el cambio en las condiciones de operación en el presente experimento respecto a las condiciones aplicadas en el digestor del cual procedía el inóculo, por ejemplo, el cambio del sustrato orgánico o de la temperatura. Otros autores han reportado resultados similares. Xing et al. (2009) observaron un aumento de la diversidad de las comunidades de bacterias al disminuir la temperatura de operación de 20 a 15 °C en un reactor EGSB aplicado al tratamiento de un agua residual sintética de cervecera. Asimismo, Kovacik et al. (2010) encontraron que el paso de un agua residual sintética de cervecera a sólo acetato en un reactor UASB produjo un incremento transitorio de la diversidad de

bacterias. Lafita (2016) también observó un aumento en la diversidad de las poblaciones de bacterias de reactores EGSB que trataban disolventes orgánicos, y cuyo inóculo procedía de una industria cervecera. En el presente estudio los perfiles de bandas muestran, además, que a partir del día 36 las poblaciones de bacterias predominantes prevalecieron en el reactor hasta finalizar el estudio en el día 100. No obstante, la intensidad relativa de algunas bandas aumentó o disminuyó a lo largo del experimento. En este sentido, la banda B7 presentó una mayor intensidad en el día 36, y posteriormente, su intensidad disminuyó. Por otra parte, la intensidad de la banda B9 aumentó de manera progresiva desde el día 36 hasta el final del estudio en el día 100. Buzzini et al. (2006) también observaron que la estructura de las poblaciones de bacterias de un reactor UASB que trataba el agua residual de una planta de pulpa de papel prevaleció tras 180 días de operación.

Las secuencias del gen ARNr 16S de las 12 bandas de bacterias predominantes pertenecen a los filos *Bacterioidetes* (3), *Firmicutes* (2) *Proteobacteria* (5), *Chloroflexi* (1) y *Spirochaetes* (1). El filo *Bacterioidetes* estuvo representado por las bandas B1, B4 y B5. Las bandas B1 y B5 se identificaron como *Paludibacter propionicigenes* y *Paludibacter jiangxiensis*. Ambas bacterias son microorganismos anaerobios estrictos que crecen en el intervalo de temperatura de 15 a 35 °C, y que utilizan varios azúcares, entre ellos glucosa y fructosa, para la producción de acetato y propionato, principalmente (Qiu et al., 2014; Ueki et al., 2006). *Paludibacter* sp. se ha identificado en reactores de alta carga que operan a bajas temperaturas (O'Reilly et al., 2010). La banda B4, que presentó similitud con *Dysgonomonas alginatilytica*, no se detectó en el inóculo. Esta bacteria se ha descrito como un microorganismo anaerobio facultativo que crece en el intervalo de temperatura comprendido entre 20 y 37 °C, y que utiliza para su crecimiento alginato, además de otros sustratos como glucosa, lactosa, arabinosa, sacarosa, malato y lactato (Kita et al., 2015). La no detección de este microorganismo en el inóculo, y su presencia en todas las muestras analizadas durante la operación del reactor, demuestra que el alginato derivado de la desintegración de las esferas de PVA sirvió como sustrato para su crecimiento.

Tabla 8.5. Identificación, porcentaje de similitud y afiliación filogenética de las bandas de bacterias y arqueas aisladas y secuenciadas de los perfiles de DGGÉ.

Banda	Microorganismo más cercano	Número de acceso	PS %	Grupo filogenético
B1	<i>Paludibacter propionigenes</i>	NR_074577.1	96	<i>Bacteroidetes/Bacteroidales</i>
B2	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	NR_125700.1	79	<i>Firmicutes/Clostridiales</i>
B3	<i>Anaerolinea thermophila</i>	NR_074383.1	83	<i>Chloroflexi/Anaerolineales</i>
B4	<i>Dysgonomonas alginatilytica</i>	NR_137388.1	89	<i>Bacteroidetes/Bacteroidales</i>
B5	<i>Paludibacter jiangxiensis</i>	NR_146018.1	77	<i>Bacteroidetes/Bacteroidales</i>
B6	<i>Pelobacter propionicus</i>	NR_074975.1	99	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B7	<i>Geobacter psychrophilus</i>	NR_043075.1	97	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B8	<i>Geobacter chapellei</i>	NR_025982.1	86	<i>Proteobacteria/Desulfuromonadales</i>
B9	<i>Wolinella succinogenes</i>	NR_025942.1	84	<i>Proteobacteria/Campylobacterales</i>
B10	<i>Smithella propionica</i>	NR_024989.1	98	<i>Proteobacteria/Syntrophobacterales</i>
B11	<i>Treponema zuelzeri</i>	NR_104797.1	78	<i>Spirochaetes/Spirochaetales</i>
B12	<i>Cellulosilyticum lentocellum</i>	NR_074536.1	88	<i>Firmicutes/Clostridiales</i>
A1	<i>Methanocorpusculum aggregans</i>	NR_117749.1	100	<i>Methanomicrobiales/Methanocorpusculaceae</i>
A2	<i>Methanosaeta concilii</i>	NR_102903.1	99	<i>Methanosarcinales/Methanosaetaceae</i>
A3	<i>Methanobacterium formicicum</i>	NR_115168.1	100	<i>Methanomicrobiales/Methanobacteriaceae</i>

PS: porcentaje de similitud.

Pertenecientes al filo *Firmicutes* se identificaron los microorganismos *Clostridium cellulolyticum* (B2) y *Cellulosilyticum lentocellum* (B12), ambos del orden *Clostridiales*. *C. cellulolyticum* es una bacteria mesofílica anaerobia capaz de efectuar la fermentación de celulosa, formando principalmente etanol, acetato, lactato, formiato, CO₂ e hidrógeno, con una temperatura óptima de crecimiento en el intervalo entre 32 y 35 °C, y una temperatura mínima de 25 °C (Petitdemange et al., 1984). Aunque este microorganismo estuvo presente en el reactor durante el experimento, la intensidad de la banda (B2) disminuyó respecto al inóculo (Figura 8.10a), posiblemente debido a la temperatura de operación del reactor (inferior a 25 °C) y a la composición del sustrato. *Cellulosilyticum lentocellum* también puede efectuar la fermentación de celulosa; no obstante, este microorganismo crece en un amplio intervalo de temperatura comprendido entre 15 y 47.5 °C (Cai y Dong, 2010).

La banda B3 corresponde a *Anaerolinea Thermophila*, un microorganismo termofílico cuya temperatura óptima de crecimiento es de 55 °C (Chu et al., 2005). Esta bacteria se observó en el inóculo, pero no fue detectada posteriormente en ninguna de las muestras evaluadas. La temperatura mesofílica subóptima a la que se llevó a cabo el experimento (22.0 ± 2.6 °C; Tabla 8.1) pudo causar la desaparición de este microorganismo. La banda B11 presentó similitud con *Treponema Zuelzerae*, una bacteria fermentativa que puede utilizar varios azúcares como sustrato y que requiere CO₂ para su crecimiento, el cual tiene lugar en el intervalo de temperatura comprendido entre 20 y 40 °C (Veldkamp, 1960).

Las bandas B6 a la B10 se detectaron durante la operación de los reactores, pero no se observaron en el inóculo, lo cual sugiere que su presencia está determinada por el sustrato orgánico alimentado y las condiciones de operación del reactor. Los microorganismos asociados a las bandas indicadas pertenecen al filo *Proteobacteria*: *Pelobacter propionicus*, *Geobacter psychrophilus*, *Geobacter chapellei*, *Smithella propionica* y *Wolinella succinogenes*. A excepción de *Wolinella succinogenes*, todos los microorganismos mencionados han sido previamente identificados y sus particularidades descritas en los análisis microbiológicos de los experimentos llevados a cabo durante la realización de esta tesis doctoral. La presencia de estos microorganismos en la biomasa anaerobia desarrollada en los diferentes experimentos, pone de manifiesto su importancia dentro de la estructura microbiana que efectúa la degradación de la mezcla de disolventes orgánicos de

interés, a partir del inóculo del digestor anaerobio de Quart-Benager. La banda B9 corresponde a *Wolinella succinogenes*, un microorganismo anaerobio que oxida el hidrógeno con nitrato como aceptor de electrones (Cord-Ruwisch et al., 1998). Esta bacteria puede oxidar acetato en asociación sintrófica con *Geobacter sulfurreducens*, obteniendo como productos CO₂ y amonio a través de un mecanismo —diferente al mecanismo de transferencia de hidrógeno entre especies— en el que la cisteína media la transferencia de electrones entre los dos microorganismos (Cord-Ruwisch et al., 1998; Kaden et al., 2002).

En la Figura 8.10b se muestran los perfiles de bandas obtenidos en el análisis de las poblaciones de arqueas del inóculo y de las muestras del reactor UASB tomadas a lo largo del estudio. La diversidad poblacional en el dominio Arquea fue considerablemente más baja que en el dominio Bacteria, tal como se ha observado en otras investigaciones (Collins et al., 2003; O'Reilly et al., 2010; Oz et al., 2012) y en los ensayos de la presente tesis. En el inóculo se observaron tres bandas predominantes, A1, A2 y A3. La banda A3 desapareció tras 36 días de operación; mientras que las bandas A1 y A2 permanecieron en todas las muestras evaluadas, indicando así la estabilidad de las comunidades de arqueas pese al cambio de los parámetros operacionales, como la carga orgánica o el tiempo de retención hidráulico, durante la puesta en marcha del reactor. Bravo et al. (2017) también observaron la disminución de la diversidad de las poblaciones de arqueas durante la operación de un reactor EGSB que trataba una mezcla de disolventes orgánicos. Los autores atribuyeron este efecto al cambio en la fuente de carbono, desde un agua residual compleja, a un agua residual compuesta por pocos disolventes orgánicos.

La Banda A1 presentó una similitud idéntica con *Methanocorpusculum aggregans*, una arquea metanogénica que utiliza como sustratos H₂-CO₂ y formiato, y que requiere acetato y extracto de levadura para su crecimiento. Este microorganismo, predominante en el inóculo y en las muestras tomadas durante la operación del reactor, se caracteriza por formar pequeños agregados (Ollivier et al., 1985; Xun et al., 1989).

La banda A2 fue identificada como *Methanosaeta concilii*. Como se ha mencionado durante el desarrollo de esta tesis doctoral, las especies del género *Methanosaeta* son metanógenos acetoclásticos comúnmente predominantes en reactores anaerobios, en particular, en sistemas que operan con concentraciones

bajas de ácido acético debido a su alta afinidad por este sustrato respecto a otros metanógenos acetoclásticos pertenecientes al género *Methanosarcina* (Jetten et al., 1992; Leclerc et al., 2004; McInerney, 2001). Sin embargo, en las muestras evaluadas no se detectó ningún microorganismo asociado a *Methanosarcina*, aunque la concentración de ácido grasos se mantuvo en valores relativamente altos ($370 \pm 276 \text{ mg L}^{-1}$) durante las tres fases de operación, y a que las especies que conforman este género pueden utilizar otros sustratos para la formación de metano como $\text{H}_2\text{-CO}_2$ y formiato. Al respecto, se ha señalado que además de la concentración de acetato, otros factores como la carga orgánica, la carga hidráulica, y la concentración de nutrientes determinan la presencia de estos dos microorganismos en reactores anaerobios (Liu y Whitman, 2008; Schmidt y Ahring, 1996). Debido a la sensibilidad de *Methanosarcina* a la turbulencia y al estrés hidráulico, la estrategia de puesta en marcha del reactor con un aumento rápido de la carga orgánica pudo favorecer la presencia de *Methanosaeta*, en virtud de su eficiente adhesión y su participación en la formación de gránulos.

La banda A3, correspondiente a *Methanobacterium formicicum*, se observó en el inóculo y posteriormente no fue detectada en el resto de las muestras analizadas. Las especies del género *Methanobacterium* son microorganismos hidrogenotróficos que producen metano a partir de $\text{H}_2\text{-CO}_2$, formiato e isopropanol- CO_2 , con una temperatura óptima de crecimiento en el intervalo entre 37 y 45 °C (Liu y Whitman, 2008). La temperatura de operación del reactor pudo ejercer una presión selectiva sobre este microorganismo causando su desaparición.

Al igual que en los análisis microbiológicos realizados en los otros capítulos que conforman esta tesis doctoral, las arqueas metanogénicas del género *Methanocorpusculum* fueron predominantes en el fango obtenido tras 100 días de operación, indicando su funcionalidad en la ruta hidrogenotrófica y acetogénica para la degradación anaerobia del agua residual de interés hasta metano.

8.3 CONCLUSIONES

En este capítulo se ha evaluado la puesta en marcha de un reactor UASB aplicado al tratamiento continuo de un agua residual sintética de interés industrial, a partir de un fango en suspensión en presencia de esferas de PVA. Las principales

conclusiones extraídas de los resultados que se discuten en el presente estudio se exponen a continuación:

La puesta en marcha del reactor UASB empleado para el tratamiento continuo de un agua residual sintética que contiene etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol a temperatura ambiente y a partir de un fango en suspensión, se consiguió de manera satisfactoria en un tiempo de operación de 100 días, alcanzando la carga orgánica de tratamiento establecida de $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ con una eficacia de eliminación superior al 90 %.

Los resultados correspondientes al seguimiento del reactor evidenciaron la desintegración de las esferas de PVA. Puesto que en la bibliografía se han descrito las esferas de gel de PVA como un material eficaz para la formación de gránulos en sistemas de tratamiento de aguas residuales, se deduce que el método empleado para su elaboración no fue el adecuado para garantizar su estabilidad en el medio en presencia de los disolventes. Los resultados muestran, además, que dada la naturaleza orgánica de los compuestos utilizados para la formación de las esferas — PVA y alginato—, su presencia en el sistema pudo afectar a la estimación de los parámetros de rendimiento del reactor, tales como la eficacia de eliminación de la materia orgánica soluble y el rendimiento de la producción de metano. Pese a ello, este último parámetro presentó un valor de $0.304 \pm 0.006 \text{ NmL CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1} \text{ degradada}$ a partir de los datos de los periodos de operación en los que no se observó desintegración de esferas de PVA.

Como se ha demostrado en otros experimentos llevados a cabo en esta tesis doctoral, la eficacia de eliminación del disolvente 1-etoxi-2-propanol en reactores de lecho granular es moderada. En este estudio la capacidad de eliminación resultó ser del 66 % aplicando cargas orgánicas bajas comprendidas en el intervalo entre 0.06 y $1.58 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

La desintegración de las esferas de PVA durante el transcurso del estudio impide determinar su influencia en el sistema como bioportadores para la formación de biomasa granular. No obstante, la estrategia de puesta en marcha del reactor con un incremento gradual de la carga orgánica y posiblemente la presencia de alginato en el medio —un polisacárido que ha sido identificado como parte de los polímeros extracelulares que secretan los microorganismos durante la formación de gránulos— permitió la formación rápida de biomasa granular, tal

como lo indicó el incremento del tamaño medio de partícula desde 85 hasta 441 μm tras 30 días de operación. Las características fisicoquímicas de los gránulos formados se ajustaron a los valores reportados en la bibliografía.

El análisis de la evolución microbiológica del fango anaerobio evidenció el aumento de la diversidad de las poblaciones en el dominio Bacteria respecto al inóculo. Las poblaciones de bacterias predominantes en la biomasa granular pertenecen, en su mayoría, a los filos *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*. Los microorganismos que representan este último filo se identificaron en todas las muestras analizadas, excepto en el inóculo, lo cual demuestra que su presencia pudo estar asociada a la composición del agua residual sintética de interés y a las condiciones de operación del reactor. Dichos microorganismos presentaron similitud con los géneros *Pelobacter*, *Geobacter*, *Smithella* y *Wolinella*, asociados a la degradación sintrófica de sustratos orgánicos, incluidos alcoholes y ácidos grasos volátiles. El análisis de las comunidades de bacterias demostró, además, que el alginato pudo servir como sustrato para el crecimiento de algunos microorganismos como *Dysgonomonas alginatilytica*.

Del análisis de las poblaciones de arqueas destaca, tal como se ha presentado en los diferentes estudios de esta tesis doctoral, la predominancia del género *Methanocorpusculum*. En este estudio, en particular, se identificó la especie *Methanocorpusculum aggregans*, un microorganismo capaz de formar pequeños agregados. La predominancia de *Methanocorpusculum* refleja su importancia para efectuar la conversión de disolventes orgánicos de interés industrial en reactores inoculados con un fango en suspensión, actuando en asociación sintrófica con bacterias acetogénicas. Si bien la concentración de ácidos grasos volátiles presentó valores relativamente altos durante las tres fases de operación, *Methanosaeta* fue el único metanógeno acetoclástico identificado en el reactor, demostrando que además de la concentración de ácidos grasos en el medio, otros parámetros operacionales determinan la prevalencia de este microorganismo en reactores de tipo UASB.

9 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis doctoral se ha estudiado la formación y la evolución de biomasa granular en reactores anaerobios de alta carga empleados para el tratamiento anaerobio de un agua residual sintética contaminada con los disolventes orgánicos etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, e inoculados con fangos anaerobios en suspensión. Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo se enuncian a continuación:

- I. Es posible formar biomasa granular con buenas características fisicoquímicas durante el tratamiento de un agua residual que contiene los disolventes orgánicos indicados en reactores de tipo UASB, inoculados con un fango en suspensión y operando a una temperatura mesofílica subóptima tanto en condiciones de alimentación continua de sustrato, como en condiciones de alimentación intermitente.
- II. Los resultados del presente trabajo han puesto de manifiesto la eficacia del polímero natural quitosano como coadyuvante del proceso de formación de biomasa granular en reactores anaerobios que tratan disolventes orgánicos de interés industrial. La adición de dos dosis únicas de quitosano durante la puesta en marcha de reactores UASB operando con alimentación continua de agua residual permitió reducir entre 58 y 115 días el tiempo necesario para el desarrollo de gránulos, posibilitando la disminución del tiempo requerido para alcanzar las cargas orgánicas seleccionadas con altas eficacias de eliminación. La adecuada dosificación de quitosano durante la puesta en marcha de reactores UASB, operando con alimentación intermitente de agua residual en un patrón de 16 horas al día durante 7 días a la semana, afectó positivamente al proceso de granulación, alcanzándose un porcentaje de biomasa del 51.9-62.6 % en tan sólo 20 días de operación. Sin embargo, la alimentación intermitente de sustrato orgánico afecta a la etapa de maduración de los agregados que se forman mediante la adición del polímero.
- III. En los sistemas evaluados fue posible favorecer la formación de biomasa granular propiciando una presión selectiva del fango en suspensión, al aumentar la carga orgánica volumétrica. El aumento de la carga hidráulica, ligado a la disminución del tiempo de retención hidráulico, y el aumento en la producción de biogás conforme se produjo el aumento de la carga orgánica, propiciaron la formación de biomasa granular. La adición de

quitosano favoreció la formación de agregados en un menor tiempo, disminuyendo así el periodo requerido para tratar las cargas orgánicas seleccionadas con resultados superiores en cuanto a rendimiento.

- IV. La dosificación de quitosano, tanto de manera puntual como periódica, demostró un efecto positivo sobre la eficacia de operación de los reactores. Los reactores operados con la adición de quitosano mostraron una degradación más estable del sustrato orgánico alimentado, con rendimientos de metano superiores y un lavado inferior de biomasa, en virtud de la mejora del proceso de formación de biomasa granular, en comparación con los reactores de control a los que no se añadió el polímero.
- V. Se ha demostrado la eficacia de los reactores UASB para el tratamiento en continuo del agua residual sintética contaminada con los disolventes orgánicos. Los reactores presentaron eficacias de eliminación superiores al 90 % y rendimientos de metano entre 0.292 ± 0.008 y 0.335 ± 0.005 $\text{Nm}^3 \text{CH}_4 \text{ kg DQO}^{-1}_{\text{degradada}}$ tratando cargas orgánicas de hasta 20 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ con un tiempo de retención hidráulico de 6 horas. Del mismo modo, se demostró la robustez del tratamiento intermitente del agua residual contaminada con disolventes orgánicos al obtener una operación estable con eficacias de eliminación superiores al 94 % al aplicar cargas orgánicas de hasta 50 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.
- VI. En este estudio se ha demostrado que es posible obtener altas eficacias de eliminación durante la puesta en marcha de reactores de tipo UASB inoculados con fango en suspensión y alimentados intermitentemente con agua residual contaminada con disolventes orgánicos, aplicando cargas orgánicas volumétricas moderadas de hasta 13 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.
- VII. La alimentación intermitente del agua residual afectó al rendimiento de metano de los reactores, obteniéndose valores inferiores a los registrados durante la operación con alimentación continua.
- VIII. Ha quedado demostrado que después de 8 horas sin alimentación de sustrato orgánico es posible la rápida recuperación de la actividad metanogénica específica en reactores UASB operando con altas cargas orgánicas entre 20 y 50 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Los periodos de interrupción más

extensos, de 56 horas, afectaron en mayor medida a la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios, con una mayor concentración de ácidos grasos volátiles en el efluente y menores rendimientos de metano.

- IX. En esta tesis se ha comprobado que, durante el tratamiento intermitente del agua residual con los disolventes orgánicos de interés y aplicando altas cargas orgánicas, se puede producir la pérdida parcial de la estabilidad estructural de los gránulos. No obstante, el balance dinámico entre el deterioro de los gránulos y la agregación de las partículas permitió mantener un alto porcentaje de gránulos. Los resultados sugieren que la pérdida de la integridad de los gránulos se produce por el estrés hidrodinámico causado durante la operación intermitente de los reactores, y no debido a un efecto adverso de la composición del afluente sobre la biomasa.
- X. El método empleado para la elaboración de las esferas de PVA, utilizadas como bioportadores de biomasa para la puesta en marcha de un reactor UASB, no fue el adecuado para garantizar su estabilidad en el medio en presencia de los disolventes orgánicos, produciéndose su desintegración. La estrategia de puesta en marcha del reactor con un incremento gradual de la carga orgánica y, posiblemente, la presencia de alginato en el medio, permitió la formación rápida de biomasa granular.
- XI. La biodegradabilidad anaerobia del disolvente orgánico 1-etoxi-2-propanol es moderada bajo las condiciones de operación evaluadas. Los resultados del seguimiento de la operación de los reactores y el análisis de la actividad metanogénica específica del fango granular indicaron que la etapa la escisión del enlace éter de glicol sería la etapa limitante para la conversión de este compuesto orgánico en metano.
- XII. Las características fisicoquímicas del fango granular desarrollado en los diferentes estudios se ajustaron a los intervalos de valores que se recogen en la bibliografía para describir fangos granulares de buena calidad. En particular, en todos los ensayos realizados destaca la alta actividad metanogénica del fango formado en condiciones mesofílicas subóptimas.

- XIII. El estudio de la dinámica de las poblaciones microbianas demostró que en los reactores evaluados en los diferentes ensayos se estableció una comunidad de microorganismos similar, caracterizada por la predominancia de las arqueas metanogénicas del género *Methanocorpusculum* y de las bacterias sintróficas de los géneros *Geobacter* y *Desulfovibrio*. La fuente de carbono orgánico suministrada fue el factor determinante en el cambio de la estructura de las comunidades microbianas de los reactores de alta carga empleados para el tratamiento de los disolventes orgánicos de interés industrial estudiados en esta tesis doctoral, e inoculados con fangos en suspensión.
- XIV. La predominancia de metanógenos hidrogenotróficos y la ausencia de metanógenos capaces de utilizar el etanol como un sustrato para la formación de metano, indica que la degradación hasta metano del agua residual se produjo mediante interacciones sintróficas entre bacterias y microorganismos metanogénicos. A partir de los resultados del estudio de las poblaciones microbianas se sugirió que la ruta de oxidación sintrófica del acetato pudo tener lugar durante el tratamiento del agua residual contaminada con los disolventes orgánicos. No obstante, se requieren estudios específicos para confirmar esta hipótesis.

En esta tesis doctoral se ha evaluado de forma integral la formación y evolución de biomasa granular durante el tratamiento de efluentes contaminados con una mezcla de disolventes orgánicos representativa de las emisiones atmosféricas de la industria flexográfica. Esta tesis abarca aspectos operacionales, fisicoquímicos y microbiológicos que aportan información sobre el proceso de granulación de fangos en suspensión, con la novedad del sustrato orgánico utilizado. Con el fin de profundizar en la viabilidad de sustituir el uso de fango granular por un fango en suspensión para el tratamiento de este tipo de efluentes en reactores de alta carga, se propone continuar trabajando en:

- I. El estudio del proceso de formación de biomasa granular en presencia de otros disolventes orgánicos de interés en el sector de la impresión flexográfica, por ejemplo, el isopropanol, y de mezclas con composición variable. Asimismo, resulta de interés, como un escenario más próximo a condiciones de operación industrial, el estudio del efecto de la variación de la composición del agua residual sintética sobre las características

fisicoquímicas y microbiológicas de fangos granulares que tratan disolventes orgánicos.

- II. El estudio de la formación de biomasa granular utilizando otros polímeros o materiales como coadyuvantes.
- III. A fin de optimizar el proceso de degradación anaerobia de efluentes contaminados con disolventes orgánicos, resulta necesario profundizar en el efecto del sustrato y de la procedencia del fango inóculo sobre la estructura de las comunidades microbianas en experimentos a largo plazo.
- IV. La realización de estudios cinéticos y microbiológicos más completos que permitan determinar las rutas metabólicas que tienen lugar durante la degradación de los disolventes orgánicos de interés y os microorganismos y factores operacionales asociados.

10 NOMENCLATURA

ABR	<i>Anaerobic baffled reactor</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGV	Concentración de ácidos grasos volátiles (mg CH ₃ COOH L ⁻¹)
AME	Actividad metanogénica específica (ml CH ₄ g SSV d ⁻¹)
AMPTS	<i>Automatic Methane Potential Test System</i>
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ASBR	<i>Anaerobic sequencing batch reactor</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
C	Citosina
C_e	Concentración afluente
C_G	Concentración de metano en el espacio de cabeza después del equilibrio (mg L ⁻¹)
CI	Carbono inorgánico
CI_t	Coefficiente de integridad
C_L	Concentración de metano en la fase líquida (mg L ⁻¹),
CO	Carga orgánica (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)
COT	Carbono orgánico total
COV	Compuestos orgánicos volátiles
COVNM	Compuestos orgánicos volátiles distintos de metano
CT	Carbono total
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DQO	Demanda química de oxígeno
E2P	1-etoxi-2-propanol
EC	<i>European Comission</i>
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales

EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EE	Eficacia de eliminación de la DQO (%)
EEA	<i>European Environment Agency</i>
EE_{CH4}	Eficacia de recuperación de metano (%)
EE_{E2P}	Eficacia de eliminación del 1-etoxi-2-propanol (%)
EGSB	<i>Expanded granular sludge bed reactor</i>
EPS	<i>Extracellular polymeric substances</i>
EU	<i>European Union</i>
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido Guanina
G	Guanina
GAC	<i>Granular activated carbon</i>
H	Constante de la ley de Henry
IC	<i>Internal circulation reactor</i>
IR	Infrarrojo
IVF	Índice volumétrico de fangos (mL g SST ⁻¹)
LED	<i>Light emitting diode</i>
M2P	1-metoxi-2-propanol
MAPAMA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MDT	Mejores técnicas disponibles
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAC	<i>Powered activated carbon</i>
PBM	Potencial bioquímico del metano (mL CH ₄ g DQO ⁻¹)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilenglicol
ppm	Partes por millón

ppm_v	Partes por millón volumétricas
P_T	Presión total (atm)
PVA	<i>Polyvinyl alcohol</i>
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i>
R	Reactor
R1	Reactor 1
R2	Reactor 2
R3	Reactor 3
SST	Sólidos suspendidos totales (mg L ⁻¹)
SSV	Sólidos suspendidos volátiles (mg L ⁻¹)
t	Tiempo
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TRH	Tiempo de retención hidráulico (d)
TRS	Tiempo de retención de sólidos (d)
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket reactor</i>
UNT	Unidad nefelométrica de turbidez
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
V_a	Velocidad ascensional del líquido (m h ⁻¹)
V_s	Velocidad de sedimentación (m h ⁻¹)
x_g	Fracción molar del gas en el agua, mol gas mol ⁻¹ agua

Letras Griegas

ΔG°'	Cambio en la energía libre de Gibbs (kJ reacción ⁻¹)
ΔG_{adh}	Energía libre de adhesión (kJ reacción ⁻¹)
φ	Diámetro medio de partícula (μm)

11 BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, T., Abbasi, S.A., 2012. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 1696-1708.
- Ahn, J., McIlroy, S., Schroeder, S., Seviour, R., 2009. Biomass granulation in an aerobic:anaerobic-enhanced biological phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with varying pH. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 885-893.
- Ahn, Y.H., Min, K.S., Speece, R.E., 2001. Full scale UASB reactor performance in the brewery industry. *Environ. Technol.* 22, 463-476.
- Akarsubasi, A.T., Ince, O., Oz, N.A., Kirdar, B., Ince, B.K., 2006. Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. *Process Biochem.* 41, 28-35.
- Alphenaar, P.A., 1995. Anaerobic granular sludge: characterization, and factors affecting its functioning. PhD Tesis. Agricultural University of Wageningen.
- Alphenaar, P.A., Prez, M.C., Lettinga, G., 1993a. The influence of substrate transport limitation on porosity and methanogenic activity of anaerobic sludge granules. *Appl Microbiol Biotechnol* 39, 276-280.
- Alphenaar, P.A., Visser, A., Lettinga, G., Arne Alphenaar, P., Visser, A., Lettinga, G., 1993b. The effect of liquid upward velocity and hydraulic retention time on granulation in UASB reactors treating wastewaters with high sulphate content. *Bioresour. Technol.* 43, 249-258.
- Antwi, P., Li, J., Opoku Boadi, P., Meng, J., Shi, E., Xue, C., Zhang, Y., Ayivi, F., 2017. Functional bacterial and archaeal diversity revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing during potato starch processing wastewater treatment in an UASB. *Bioresour. Technol.* 235, 348-357.
- APHA, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Ariyavongvivat, E., Suraraksa, B., Chaiprasert, P., 2015. Physicochemical and Biological Characteristics of Enhanced Anaerobic Microbial Granulation by Synthetic and Natural Cationic Polymers. *Energy Procedia* 79, 851-858.
- Aydin, S., 2016. Microbial sequencing methods for monitoring of anaerobic treatment of antibiotics to optimize performance and prevent system failure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5313-5321.

- Aydin, S., Ince, B., Ince, O., 2015. Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater. *Water Res.* 83, 337-344.
- Azman, S., Khadem, A.F., van Lier, J.B., Zeeman, G., Plugge, C.M., 2015. Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 2523-2564.
- Batstone, D.J., Keller, J., 2001. Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type. *Water Res.* 35, 1723-1729.
- Batstone, D.J., Keller, J., Blackall, L.L., 2004. The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water Res.* 38, 1390-1404.
- Bernstein, J.A., Alexis, N., Bacchus, H., Bernstein, I.L., Fritz, P., Horner, E., Li, N., Mason, S., Nel, A., Oullette, J., Reijula, K., Reponen, T., Seltzer, J., Smith, A., Tarlo, S.M., 2008. The health effects of nonindustrial indoor air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 585-591.
- Bhunia, P., Ghangrekar, M.M., 2008. Influence of biogas-induced mixing on granulation in UASB reactors. *Biochem. Eng. J.* 41, 136-141.
- Bhunia, P., Ghangrekar, M.M., 2007. Required minimum granule size in UASB reactor and characteristics variation with size. *Bioresour. Technol.* 98, 994-999.
- Bialek, K., Cysneiros, D., O'Flaherty, V., 2014. Hydrolysis, acidification and methanogenesis during low-temperature anaerobic digestion of dilute dairy wastewater in an inverted fluidised bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8737-8750.
- Bialek, K., Cysneiros, D., O'Flaherty, V., 2012a. Low-Temperature (10 °C) Anaerobic Digestion of Dilute Dairy Wastewater in an EGSB Bioreactor: Microbial Community Structure, Population Dynamics, and Kinetics of Methanogenic Populations. *Archaea* 2013.
- Bialek, K., Kumar, A., Mahony, T., Lens, P.N.L., O'Flaherty, V., 2012b. Microbial community structure and dynamics in anaerobic fluidized-bed and granular sludge-bed reactors: Influence of operational temperature and reactor configuration. *Microb. Biotechnol.* 5, 738-752.
- Bitton, G., Malek, A., Zullo, L.C., Daoutidis, P., 2016. Wasterwater microbiology,

Industrial and Engineering Chemistry Research.

- Boone, D.R., Whitman, W.B., Rouvière, P., 1993. Diversity and Taxonomy of Methanogens. *Methanogenesis* 35-80.
- Bourven, I., Bachellerie, G., Costa, G., Guibaud, G., 2015. Evidence of glycoproteins and sulphated proteoglycan-like presence in extracellular polymeric substance from anaerobic granular sludge. *Environ. Technol.* 36, 2428-2435.
- Bratby, J., 2006. *Coagulation and Flocculation in Water and Wastewater Treatment - Second Edition*. Water Intell. Online 5.
- Bravo, D., 2017. Control of volatile organic compounds from air emissions by anaerobic bioscrubber: process performance and process simulation. PhD Thesis. Universitat de València.
- Bravo, D., Ferrero, P., Penya-roja, J.M., Álvarez-Hornos, F.J., Gabaldón, C., 2017. Control of VOCs from printing press air emissions by anaerobic bioscrubber: performance and microbial community of an on-site pilot unit. *J. Environ. Manage.* 197, 287-295.
- Bryant, M.P., Campbell, L.L., Reddy, C.A., Crabill, M.R., 1977. Growth of *Desulfovibrio* in Lactate or Ethanol Media Low in Sulfate in Association with H₂-Utilizing Methanogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1162-1169.
- Bryant, M.P., Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S., 1967. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 59, 20-31.
- Buzzini, A.P., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B., Pires, E.C., 2006. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochem.* 41, 168-176.
- Cai, S., Dong, X., 2010. *Cellulosilyticum ruminicola* gen. nov., sp. nov., isolated from the rumen of yak, and reclassification of *Clostridium lentocellum* as *Cellulosilyticum lentocellum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 845-849.
- Cao, F., Bourven, I., van Hullebusch, E.D., Pechaud, Y., Lens, P.N.L., Guibaud, G., 2017. Hydrophobic molecular features of EPS extracted from anaerobic granular sludge treating wastewater from a paper recycling plant. *Process Biochem.* 58, 266-275.
- Capela, I., Bilé, M.J., Silva, F., Nadais, H., Prates, A., Arroja, L., 2009. Hydrodynamic

- behaviour of a full-scale anaerobic contact reactor using residence time distribution technique. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 716-724.
- Centurion, V.B., Moura, A.G.L., Delforno, T.P., Okada, D.Y., Dos Santos, V.P., Varesche, M.B.A., Oliveira, V.M., 2018. Anaerobic co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage in a pilot-scale EGSB reactor: The influence of surfactant concentration on microbial diversity. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 127, 77-86.
- Chaikasem, S., 2015. Effect of PVA-Gel on Performance Improvement of a Two Stage Thermophilic Anaerobic Membrane Bioreactor. Asian Institute of Technology.
- Chen, C.L., Wu, J.H., Liu, W.T., 2008. Identification of important microbial populations in the mesophilic and thermophilic phenol-degrading methanogenic consortia. *Water Res.* 42, 1963-1976.
- Chen, S., Rotaru, A.E., Liu, F., Philips, J., Woodard, T.L., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2014. Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic co-cultures. *Bioresour. Technol.* 173, 82-86.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044-4064.
- Chernicharo, C., 2007. *Anaerobic Reactors, Biological Wastewater Treatment Series.* IWA Publishing, London.
- Chong, S., Sen, T.K., Kayaalp, A., Ang, H.M., 2012. The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment - A State-of-the-art review. *Water Res.* 46, 3434-3470.
- Chu, L.B., Yang, F.L., Zhang, X.W., 2005. Anaerobic treatment of domestic wastewater in a membrane-coupled expanded granular sludge bed (EGSB) reactor under moderate to low temperature. *Process Biochem.* 40, 1063-1070.
- Chua, H., Hu, W.F., Yu, P.H.F., Cheung, M.W.L., 1997. Responses of an anaerobic fixed-film reactor to hydraulic shock loadings. *Bioresour. Technol.* 61, 79-83.
- Coates, J.D., Bhupathiraju, V.K., Achenbach, L.A., Mcinerney, M.J., Lovley, D.R., 2001. *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 581-588.
- Collins, G., Mahony, T., O'Flaherty, V., 2006. Stability and reproducibility of low-

- temperature anaerobic biological wastewater treatment. FEMS Microbiol. Ecol. 55, 449-458.
- Collins, G., Woods, A., McHugh, S., Carton, M.W., O'Flaherty, V., 2003. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. FEMS Microbiol. Ecol. 46, 159-170.
- Comisión Europea, 2015. Comunicación de la Comisión al Parlamento europeo, al Consejo, al Comité económico y social europeo y al Comité de las regiones - Cerrar el círculo: un plan de acción de la UE para la economía circular, Diario Oficial de las Comunidades Europeas.
- Comisión Europea, 2009. Sistemas de Gestión y Tratamiento de Aguas y Gases Residuales en el Sector Químico. Documento BREF.
- Conklin, A., Stensel, H.D., Ferguson, J., 2006. Growth Kinetics and Competition Between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in Mesophilic Anaerobic Digestion. Water Environ. Res. 78, 486-496.
- Connaughton, S., Collins, G., Flaherty, V., 2006a. Psychrophilic and mesophilic anaerobic digestion of brewery effluent: A comparative study. Water Res. 40, 2503-2510.
- Connaughton, S., Collins, G., O'Flaherty, V., 2006b. Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18 °C. Water Res. 40, 1009-1017.
- Connelly, S., Shin, S.G., Dillon, R.J., Ijaz, U.Z., Quince, C., Sloan, W.T., Collins, G., 2017. Bioreactor scalability: Laboratory-scale bioreactor design influences performance, ecology, and community physiology in expanded granular sludge bed bioreactors. Front. Microbiol. 8.
- Conrad, R., Wetter, B., 1990. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. Arch. Microbiol. 155, 94-98.
- Cord-Ruwisch, R., Lovley, D.R., Schink, B., 1998. Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2232-2236.
- Costa, J.C., Moita, I., Ferreira, E.C., Alves, M.M., 2009. Morphology and physiology of anaerobic granular sludge exposed to an organic solvent. J. Hazard. Mater.

167, 393-398.

- Couras, C.S., Louros, V.L., Grilo, A.M., Leitão, J.H., Capela, M.I., Arroja, L.M., Nadais, M.H., 2014. Effects of operational shocks on key microbial populations for biogas production in UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reactors. *Energy* 73, 866-874.
- Cox, L., & Russell, D. (2003). Using Bioreactors To Control Air Pollution. United States Environmental Protection Agency.
- Crone, B.C., Garland, J.L., Sorial, G.A., Vane, L.M., 2016. Significance of dissolved methane in effluents of anaerobically treated low strength wastewater and potential for recovery as an energy product: A review. *Water Res.* 104, 520-531.
- Cronin, C., Lo, K. V., 1998. Anaerobic treatment of brewery wastewater using UASB reactors seeded with activated sludge. *Bioresour. Technol.* 64, 33-38.
- D'Abzac, P., Bordas, F., van Hullebusch, E., Lens, P.N.L., Guibaud, G., 2010. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: Comparison of chemical and physical extraction protocols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1589-1599.
- Daffonchio, D., Thaveesri, J., Verstraete, W., 1995. Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3676-3680.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* (80-.). 280, 295-298.
- de Bok, F.A.M., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Res.* 38, 1368-1375.
- de Zeeuw, W.J., 1987. Granular sludge in UASB reactors, en: Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J.T.C., Hulshoff Pol, L.W. (Eds.), *Granular Anaerobic Sludge, Microbiology and technology*. The Netherlands: Pudoc. Wageningen, pp. 132-1.
- de Zeeuw, W.J., 1984. Acclimatization of Anaerobic Sludge for UASB-Reactor Start-Up. PhD Thesis. Agricultural University of Wageningen.
- Delhoménie, M.C., Heitz, M., 2005. Biofiltration of air: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 53-72.

- Demirel, B., Scherer, P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 173-190.
- Derwent, R.G., 1995. Sources, Distributions, and Fates of VOCs in the Atmosphere, en: R. M Harrison and R. E Hester (Ed.), *Volatile Organic Compounds in the Atmosphere*. pp. 1-15.
- Deshusses, M.A., Cox, H.H., Deshusses, M.A., 1997. Biological waste air treatment in biotrickling filters. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 335-339.
- Diaz, E.E., Stams, A.J.M., Amils, R., Sanz, J.L., 2006. Phenotypic Properties and Microbial Diversity of Methanogenic Granules from a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor Treating Brewery Wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4942-4949.
- Diekert, G., Wohlfarth, G., 1994. Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 209-221.
- Ding, Z., Bourven, I., Guibaud, G., van Hullebusch, E.D., Panico, A., Pirozzi, F., Esposito, G., 2015. Role of extracellular polymeric substances (EPS) production in bioaggregation: application to wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9883-9905.
- Dolfing, J., 1987. Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. PhD Thesis. Agricultural University of Wageningen.
- Dubois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J, K., Rebers, P., Smith, F., Duobis, M., Gilles, K. a., Hamilton, J.K., Rebers, P. a., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Dubourgier, H., Prensier, G., Albagnac, G., 1987. Structure and microbial activities of granular anaerobic sludge, en: Lettinga, G., Zehnder, A., Grotenhuis, J., Hulshoff Pol, L. (Eds.), *Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology*. Pudoc, Wageningen, The Netherlands, The Netherlands, pp. 18–33.
- EEA, 2017a. Air quality in Europe. EEA report 13/2017, European Environment Agency. Luxembourg.
- EEA, 2017b. European Union emission inventory report 1990–2015 under the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP). EEA report 9/2017. Luxembourg.

- EEA, 2017c. Emissions of the main air pollutants in Europe — European Environment Agency. *Disponible en línea: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/main-anthropogenic-air-pollutant-emissions/assessment-5/#indicator-specification-and-metadata>* (Fecha de acceso 10.16.17).
- EEA, 2016a. Air quality in Europe. EEA report 28/2016. Luxembourg.
- EEA, 2016b. Industrial processes and product use, en: European Environmental Agency (Ed.), EMEP/EEA air pollutant emission inventory guidebook. Technical guidance to prepare national emission inventories. EEA Report 21/2016. Publications Office of the European Union, Luxembourg, pp. 1-22.
- EEA, 2015. Air quality in Europe. EEA report 5/2015, European Environment Agency. Luxembourg.
- Eichler, B., Schink, B., 1985. Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Arch. Microbiol.* 143, 60-66.
- El-Mamouni, R., Guiot, S.R., Leduc, R., Costerton, J.W., 1995. Characterization of different microbial nuclei as potential precursors of anaerobic granulation. *J. Biotechnol.* 39, 239-249.
- El-Mamouni, R., Leduc, R., Guiot, S.R., 1998. Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Sci. Technol.* 38, 341-347.
- El-Mamouni, R., Leduc, R., Guiot, S.R., Guiot, S.R., 1997. Influence of the starting microbial nucleus type on the anaerobic granulation dynamics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 189-194.
- Enright, A.M., McGrath, V., Gill, D., Collins, G., O'Flaherty, V., 2009. Effect of seed sludge and operation conditions on performance and archaeal community structure of low-temperature anaerobic solvent-degrading bioreactors. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 65-79.
- Enright, A.M., McHugh, S., Collins, G., O'Flaherty, V., 2005. Low-temperature anaerobic biological treatment of solvent-containing pharmaceutical wastewater. *Water Res.* 39, 4587-4596.
- European Commission, 2007. Reference Document on Best Available Techniques on Surface Treatment using. Sevilla, Spain, Spain.
- European Commission, 2014. Best Available Techniques (BAT) Reference Document

for Common Waste water and Waste Gas the Chemical Sector.

- Fang, H.H.P., Chui, H.K., Li, Y.Y., 1995. Effect of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules. *Water Sci. Technol.* 32, 165-172.
- Ferguson, R.M.W., Coulon, F., Villa, R., 2016. Organic loading rate: A promising microbial management tool in anaerobic digestion. *Water Res.* 100, 348-356.
- Ferrero, P., San-Valero, P., Gabaldón, C., Martínez-Soria, V., Peña-roja, J.M., 2018. Anaerobic degradation of glycol ether-ethanol mixtures using EGSB and hybrid reactors: Performance comparison and ether cleavage pathway. *J. Environ. Manage.* 213, 159-167.
- Fiedler, N., Laumbach, R., Kelly-McNeil, K., Liou, P., Fan, Z.H., Zhang, J., Ottenweller, J., Ohman-Strickland, P., Kipen, H., 2005. Health effects of a mixture of indoor air volatile organics, their ozone oxidation products, and stress. *Environ. Health Perspect.* 113, 1542-1548.
- Frimmer, U., Widdel, F., 1989. Oxidation of ethanol by methanogenic bacteria. *Arch. Microbiol.* 152, 479-483.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Pollut. Res. Control Bright.* 5, 1749-1758.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Nagai, S., 1995. High rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in upflow anaerobic sludge blanket reactors fed with various defined substrates. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 354-359.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Sakurai, H., Nagai, S., 1991. Characteristics of Methanogenic Granules Grown on Propionate in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 50-57.
- Fykse, E.M., Aarskaug, T., Madslie, E.H., Dybwad, M., 2016. Microbial community structure in a full-scale anaerobic treatment plant during start-up and first year of operation revealed by high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Bioresour. Technol.* 222, 380-387.
- Gagliano, M.C., Neu, T.R., Kuhlicke, U., Sudmalis, D., Temmink, H., Plugge, C.M., 2018. EPS glycoconjugate profiles shift as adaptive response in anaerobic microbial granulation at high salinity. *Front. Microbiol.* 9, 1-16.
- Gagliano, M.C.C., Ismail, S.B.B., Stams, A.J.M.J.M., Plugge, C.M.M., Temmink, H., van Lier, J.B., 2017. Biofilm formation and granule properties in anaerobic

- digestion at high salinity. *Water Res.* 121, 61-71.
- Garuti, G., Leo, G., Pirozzi, F., 2003. Factors affecting washout in intermittently feed upflow anaerobic reactors: Experimental tests and modelling. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 24, 627-640.
- Ghangrekar, M.M., Asolekar, S.R., Joshi, S.G., 2005. Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. *Water Res.* 39, 1123-1133.
- Ghangrekar, M.M., Asolekar, S.R., Ranganathan, K.R., Joshi, S.G., 1996. Experience with UASB reactor start-up under different operating conditions. *Water Sci. Technol.* 34, 421-428.
- Goldberg, S., Doyle, R.J., Rosenberg, M., 1990. Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *J. Bacteriol.* 172, 5650-5654.
- Gomes de Barros, V., Duda, R.M., da Silva Vantini, J., Pine Omori, W., Tiraboschi Ferro, M.I., Alves de Oliveira, R., 2017. Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and *Methanosarcina* archaea and *Thermotogae* bacteria. *Bioresour. Technol.* 244, 371-381.
- González-Gil, G., Lens, P., van Aelst, A., Versprille, A., Lettinga, G., 2001. Cluster Structure of Anaerobic Aggregates of an Expanded Granular Sludge Bed Reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3683-3692.
- Guiot, S.R., Pauss, A., Costerton, J.W., 1992. A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water Sci. Technol.* 25, 1-10.
- Gujer, W., Zehnder, A.J., 1983. Conversion Processes in Anaerobic Digestion. *Water Sci Technol* 15, 127-167.
- Han, S.K., Kim, S.H., Shin, H.S., 2005. UASB treatment of wastewater with VFA and alcohol generated during hydrogen fermentation of food waste. *Process Biochem.* 40, 2897-2905.
- Hao, L., McIlroy, S.J., Kirkegaard, R.H., Karst, S.M., Fernando, W.E.Y., Aslan, H., Meyer, R.L., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Dueholm, M.S., 2018. Novel prosthecate bacteria from the candidate phylum *Acetothermia*. *ISME J.* 1, 1-13.
- Hao, T., Xiang, P., Mackey, H.R., Chi, K., Lu, H., Chui, H., van Loosdrecht, M.C.M.,

- Chen, G.-H., 2014. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. *Water Res.* 65, 1-21.
- Henares, M., 2017. Recuperación de metano disuelto en el efluente de un reactor anaerobio de lecho expandido mediante contactores de membranas. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Henry, M.P., Donlon, B.A., Lens, P.N., Colleran, E.M., 1996. Use of anaerobic hybrid reactors for treatment of synthetic pharmaceutical wastewaters containing organic solvents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 66, 251-264.
- Henze, M., Harremöes, P., 1983. Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - a literature review. *Water Sci. Technol.* 15, 1-101.
- Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A., Brdjanovic, D., 2017. Tratamiento biológico de aguas residuales: principios, modelación y diseño. IWA Publishing, London.
- Herbert, B., Fang, H.P., Guohua, L., Jinfu, Z., Bute, C., Guowei, G., 1990. Treatment of Brewery Effluent by UASB Process. *J. Environ. Eng.* 116, 454-460.
- Hickey, R.F., Wu, W.M., Veiga, M.C., Jones, R., 1991. Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Water Sci. Technol.* 24, 207-255.
- Hirsh, R., 1984. Microcolony formation and consortia, en: Marshall, K. (Ed.), *Microbial adhesion and aggregation*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 373-393.
- Hu, Y., Jing, Z., Sudo, Y., Niu, Q., Du, J., Wu, J., Li, Y.Y., 2015. Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on UASB treatment of a synthetic sulfate-containing wastewater. *Chemosphere* 130, 24-33.
- Hudayah, N., Suraraksa, B., Chaiprasert, P., 2016. Synergistic effects of the chitosan addition and polysaccharides-EPS on the formation of anaerobic granules. *Environ. Technol.* 37, 2713-2722.
- Hudayah, N., Suraraksa, B., Chaiprasert, P., 2012. The Effect of Synthetic Cationic Polymer Addition on Nucleation of Anaerobic Granules under Different Organic Loading Rate. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.* 2, 1-6.
- Hulshoff Pol, L., de Zeeuw, W., Velzeboer, C.M., Lettinga, G., 1983. Granulation in UASB-Reactors. *Water Sci. Technol.* 15, 291-304.
- Hulshoff Pol, L., 1989. The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. PhD

Thesis. Agricultural University of Wageningen.

- Hulshoff Pol, L.W., de Castro Lopes, S.I., Lettinga, G., Lens, P.N.L., 2004. Anaerobic sludge granulation. *Water Res.* 38, 1376-1389.
- Imai, T., Ukita, M., Liu, J., Sekine, M., Nakanishi, H., Fukagawa, M., 1997. Advanced start up of UASB reactors by adding of water absorbing polymer. *Water Sci. Technol.* 36, 399-406.
- Ince, O., Kolukirik, M., Oz, N.A., Kirdar, B., Ince, B.K., 2005. Comparative evaluation of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters in terms of performance and methanogenic activity. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 138-144.
- Ismail, S.B., de La Parra, C.J., Temmink, H., van Lier, J.B., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors operated under high salinity conditions. *Water Res.* 44, 1909-1917.
- Janssen, A.J.H., Lens, P.N.L., Stams, A.J.M., Plugge, C.M., Sorokin, D.Y., Muyzer, G., Dijkman, H., Van Zessen, E., Luimes, P., Buisman, C.J.N., 2009. Application of bacteria involved in the biological sulfur cycle for paper mill effluent purification. *Sci. Total Environ.* 407, 1333-1343.
- Jeison, D., Chamy, R., 1999. Comparison of the behaviour of expanded granular sludge bed (EGSB) and upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors in dilute and concentrated wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 40, 91-97.
- Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M., Alexander, J.B.Z., 1992. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. 88:181-197. *FEMS Microbiolgy Lett.* 88, 181-197.
- Jia, Y., Wilkins, D., Lu, H., Cai, M., Lee, P.K.H., 2016. Long-term enrichment on cellulose or xylan causes functional and taxonomic convergence of microbial communities from anaerobic digesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1519-1529.
- Jiang, J., Wu, J., Zhang, Z., Poncin, S., Falk, V., Li, H.Z., 2016. Crater formation on anaerobic granular sludge. *Chem. Eng. J.* 300, 423-428.
- Jin, Y., Wang, D., Zhang, W., 2016. Treatment of high-strength ethylene glycol waste water in an expanded granular sludge blanket reactor: use of PVA-gel beads as a biocarrier. Springerplus 5.
- Jing, Z., Hu, Y., Niu, Q., Liu, Y., Li, 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. *Bioresour. Technol.* 137, 349-357.
- Kaden, J., S. Galushko, A., Schink, B., 2002. Cysteine-mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succinogenes*. *Arch. Microbiol.* 178, 53-58.
- Kalogo, Y., M'Bassiguié Séka, A., Verstraete, W., 2001. Enhancing the start-up of a UASB reactor treating domestic wastewater by adding a water extract of *Moringa oleifera* seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 644-651.
- Kampmann, K., Ratering, S., Kramer, I., Schmidt, M., Zerr, W., Schnell, S., 2012. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2106-2119.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Trably, E., Angelidaki, I., 2006. Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5138-5141.
- Kaseamchochoung, C., Lertsutthiwong, P., Phalakornkule, C., 2006. Influence of chitosan characteristics and environmental conditions on flocculation of anaerobic sludge. *Water Environ. Res.* 78, 2210-2216.
- Kato, M.T., Field, J.A., Versteeg, P., Lettinga, G., 1994. Feasibility of expanded granular sludge bed reactors for the anaerobic treatment of low-strength soluble wastewaters. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 469-479.
- Kawai, F., Hu, X., 2009. Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 227-237.
- Kennes, C., Rene, E.R., Veiga, M.C., 2009. Bioprocesses for air pollution control. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1419-1436.
- Ketheesan, B., Stuckey, D.C., 2015. Effects of hydraulic/organic shock/transient loads in anaerobic wastewater treatment: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 2693-2727.
- Khanal, S.K., 2008. Microbiology and Biochemistry of Anaerobic Biotechnology, en: Khanal, S.K. (Ed.), *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and applications*. John Wiley & Sons, Iowa, USA, pp. 29-41.
- Khemkhao, M., Nuntakumjorn, B., Techkarnjanaruk, S., Phalakornkule, C., 2011.

- Effect of chitosan on UASB treating POME during a transition from mesophilic to thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 4674-4681.
- Khemkhao, M., Techkarnjanaruk, S., Phalakornkule, C., 2016. Effect of chitosan on reactor performance and population of specific methanogens in a modified CSTR treating raw POME. *Biomass and Bioenergy* 86, 11-20.
- Kita, A., Miura, T., Okamura, Y., Aki, T., Matsumura, Y., Tajima, T., Kato, J., Nakashimada, Y., 2015. *Dysgonomonas alginatilytica* sp. Nov., an alginate-degrading bacterium isolated from a microbial consortium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3570-3575.
- Kleerebezem, R., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G., 1999. The role of benzoate in anaerobic degradation of terephthalate. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1161-1167.
- Kobayashi, T., Yan, F., Takahashi, S., Li, Y.Y., 2011. Effect of starch addition on the biological conversion and microbial community in a methanol-fed UASB reactor during long-term continuous operation. *Bioresour. Technol.* 102, 7713-7719.
- Kosaric, N., Blaszczyk, R., Orphan, L., Valladarfs, J., Blaszczyk, R., Orphan, L., Valladarfs, J., 1990. The characteristics of granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Res.* 24, 1473-1477.
- Kovacik, W.P., Scholten, J.C.M., Culley, D., Hickey, R., Zhang, W., Brockman, F.J., 2010. Microbial dynamics in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) bioreactor granules in response to short-term changes in substrate feed. *Microbiology* 156, 2418-2427.
- Kumar, A., Dewulf, J., van Langenhove, H., 2008. Membrane-based biological waste gas treatment. *Chem. Eng. J.* 136, 82-91.
- Kundu, K., Bergmann, I., Klocke, M., Sharma, S., Sreekrishnan, T.R., 2014. Influence of hydrodynamic shear on performance and microbial community structure of a hybrid anaerobic reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 462-470.
- Kundu, K., Sharma, S., Sreekrishnan, T.R., 2013. Changes in microbial communities in a hybrid anaerobic reactor with organic loading rate and temperature. *Bioresour. Technol.* 129, 538-547.
- Kundu, K., Sharma, S., Sreekrishnan, T.R., 2012. Effect of operating temperatures on the microbial community profiles in a high cell density hybrid anaerobic

- bioreactor. *Bioresour. Technol.* 118, 502-511.
- Lafita, C., 2016. Degradación de disolventes orgánicos de uso industrial en un reactor anaerobio de lecho expandido. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Lafita, C., Penya-roja, J.M., Gabaldón, C., 2015. Anaerobic removal of 1-methoxy-2-propanol under ambient temperature in an EGSB reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 2137-2146.
- Lafita, C., San-Valero, P., Marzal, P., Penya-roja, J.M., Gabaldón, C., 2017. Enhancement of biomass retention in an EGSB reactor used to treat 1-methoxy-2-propanol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*
- Lahav, O., Loewenthal, R.E., 2000. Measurement of VFA in anaerobic digestion: The five-point titration method revisited. *Water SA* 26, 389-392.
- Laspidou, C.S., Rittmann, B.E., 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.* 36, 2711-2720.
- Laurent, A., Hauschild, M.Z., 2014. Impacts of NMVOC emissions on human health in European countries for 2000-2010: Use of sector-specific substance profiles. *Atmos. Environ.* 85, 247-255.
- Leclerc, M., Delgènes, J.P., 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. *Environ. Microbiol.* 6, 809-819.
- Leitão, R.C., 2004. Robustness of UASB Reactors Treating Sewage Under Tropical Conditions. PhD Thesis. Agricultural University Wageningen.
- Leitão, R.C., Santaella, S.T., van Haandel, A.C., Zeeman, G., Lettinga, G., 2006a. The effects of hydraulic and organic shock loads on the robustness of upflow anaerobic sludge blanket reactors treating sewage. *Water Sci. Technol.* 54, 49-55.
- Leitão, R.C., van Haandel, A.C., Zeeman, G., Lettinga, G., 2006b. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. *Bioresour. Technol.* 97, 1105-1118.
- Lertsittichai, S., Lertsutthiwong, P., Phalakornkule, C., 2007. Improvement of upflow anaerobic sludge bed performance using chitosan. *Water Environ. Res.* 79, 801-807.

- Grady, C.P.L. Jr., Daigger, G.T., Love, N.G., Filipe, C.D.M., 2011. Biological Wastewater Treatment, Third. ed. IWA publishing and CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Lettinga, G., 1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 67, 3-28.
- Lettinga, G., Hulshoff Pol, L.W., Zeeman, G., 1996. Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic Treatment. Lecture notes.
- Lettinga, G., Rebac, S., Zeeman, G., 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* 19, 363-370.
- Lettinga, G., van Velsen, F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W., Klapwijk, a., 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699-734.
- Li, L., Zheng, M., Ma, H., Gong, S., Ai, G., Liu, X., Li, J., Wang, K., Dong, X., 2015. Significant performance enhancement of a UASB reactor by using acyl homoserine lactones to facilitate the long filaments of *Methanosaeta harundinacea* 6Ac. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6471-6480.
- Li, N., Xue, Y., Chen, S., Takahashi, J., Dai, L., Dai, X., 2017. Methanogenic population dynamics regulated by bacterial community responses to protein-rich organic wastes in a high solid anaerobic digester. *Chem. Eng. J.* 317, 444-453.
- Li, W., Zheng, P., Ji, J., Zhang, M., Guo, J., Zhang, J., Abbas, G., 2014. Floatation of granular sludge and its mechanism: A key approach for high-rate denitrifying reactor. *Bioresour. Technol.* 152, 414-419.
- Li, Y., Yang, S.F., Zhang, J.J., Li, X.Y., 2014. Formation of artificial granules for proving gelation as the main mechanism of aerobic granulation in biological wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 70, 548-554.
- Li, Y., Zhang, Y., Zhao, Z., Sun, S., Quan, X., Zhao, H., 2016. Enhancement of sludge granulation in hydrolytic acidogenesis by denitrification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3313-3320.
- Liamleam, W., Annachhatre, A.P., 2007. Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol. Adv.* 25, 452-463.
- Lim, S.J., Kim, T.H., 2014. Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment processes. *Biomass and Bioenergy* 60, 189-202.

- Lin, Y.M., Sharma, P.K., van Loosdrecht, M.C.M., 2013. The chemical and mechanical differences between alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic flocculent sludge and aerobic granular sludge. *Water Res.* 47, 57-65.
- Liu, H., Fang, H.H.P., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 95, 249-256.
- Liu, S., Suflita, J.M., 1994. Anaerobic biodegradation of methyl esters by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum*. *J. Ind. Microbiol.* 13, 321-327.
- Liu, X.-M., Sheng, G.-P., Zhang, F., Zeng, R.J., WU, J.-G., Yu, H.Q., 2010. Contribution of Extracellular Polymeric Substances (EPS) to the Sludge Aggregation. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4355-4360.
- Liu, Y.-Q., Liu, Y., Tay, J.-H., 2004. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 143-148.
- Liu, Y., Balkwill, D.L., Henry, C.A., Drake, G.R., Boone, D.R., 1999. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 545-556.
- Liu, Y., Boone, D.R., Sleat, R., Mah, R.A., 1985. *Methanosarcina mazei* LYC, a new methanogenic isolate which produces a disaggregating enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 608-613.
- Liu, Y., Tay, J.H., 2004. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22, 533-563.
- Liu, Y., Whitman, W.B., 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 171-189.
- Liu, Y., Xu, H. Lou, Show, K.Y., Tay, J.H., 2002. Anaerobic granulation technology for wastewater treatment. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 99-113.
- Liu, Y., Xu, H. Lou, Yang, S.F., Tay, J.H., 2003. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Res.* 37, 661-673.
- Liu, Y., Yang, S.F., Tay, J.H., Liu, Q.S., Qin, L., Li, Y., 2004. Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. *Enzyme Microb. Technol.* 34, 371-379.
- Lovley, D.R., 2017. Happy together: microbial communities that hook up to swap

- electrons. ISME J. 11, 327-336.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Farr, L.A., Randall, R.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Farr, L.A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem 193, 265-275.
- Lu, X., Zhen, G., Chen, M., Kubota, K., Li, Y.Y., 2015a. Biocatalysis conversion of methanol to methane in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor: Long-term performance and inherent deficiencies. Bioresour. Technol. 198, 691-700.
- Lu, X., Zhen, G., Estrada, A.L., Chen, M., Ni, J., Hojo, T., Kubota, K., Li, Y.Y., Ledezma, A., Chen, M., Ni, J., Hojo, T., Kubota, K., Li, Y.Y., 2015b. Operation performance and granule characterization of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating wastewater with starch as the sole carbon source. Bioresour. Technol. 180, 264-273.
- Lu, Y., Hu, S., 2017. 11 – Application of Molecular Biological Tools to Monitor Process Efficiency. Curr. Dev. Biotechnol. Bioeng. 281-291.
- Luo, G., Li, J., Li, Y., Wang, Z., Li, W.T., Li, A.M., 2016. Performance, kinetics behaviors and microbial community of internal circulation anaerobic reactor treating wastewater with high organic loading rate: Role of external hydraulic circulation. Bioresour. Technol. 222, 470-477.
- Ma, K., Liu, X., Dong, X., 2006. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 127-131.
- Ma, K., Liu, X., Dong, X., 2005. *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 325-329.
- Macleod, F.A., Guiot, S.R., Costerton, J.W., Hp, C., 1990. Layered Structure of Bacterial Aggregates Produced in an Upflow Anaerobic Sludge Bed and Filter Reactor. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1598-1607.
- Mahoney, E.M., Varangu, L.K., Cairns, W.L., Kosaric, N., Murray, R.G.E., 1987. The Effect of Calcium on Microbial Aggregation during UASB Reactor Start-Up. Water Sci. Technol. 9, 249-260.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G., 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renew. Sustain. Energy Rev. 45, 540-555.

- MAPAMA, 2017. Informative inventory report Spain-1990-2015. Ministry of Agriculture, Food and Environment.
- Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., Ng, W.J., 2015. Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems - Performance and microbial community dynamics. *Chemosphere* 140, 54-62.
- Matsumura, S., Kurita, H., Shimokobe, H., 1993. Anaerobic biodegradability of polyvinyl alcohol. *Biotechnol. Lett.* 15, 749-754.
- McCarty, P.L., 2001. The development of anaerobic treatment and its future. *Water Sci. Technol.* 44, 149-156.
- McHugh, S., Carton, M., Mahony, T., O'Flaherty, V., 2003a. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 297-304.
- McHugh, S., O'Reilly, C., Mahony, T., Colleran, E., O'Flaherty, V., 2003b. Anaerobic granular sludge bioreactor technology. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 225-245.
- McInerney, M.J., 2001. Anaerobic Metabolism and its Regulation, en: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology Set.* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., 1981. Basic Principles of Bioconversions in Anaerobic Digestion and Methanogenesis, en: Sofer, S.S., Zaborsky, O.R. (Eds.), *Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels.* Springer, Boston, MA, pp. 277-296.
- McInerney, M.J., Struchtemeyer, C.G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A.J.M., Schink, B., Rohlin, L., Gunsalus, R.P., 2008. Physiology, Ecology, Phylogeny, and Genomics of Microorganisms Capable of Syntrophic Metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 58-72.
- McKeown, R.M., Hughes, D., Collins, G., Mahony, T., O'Flaherty, V., 2012. Low-temperature anaerobic digestion for wastewater treatment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 444-451.
- McMahon, K.D., Stroot, P.G., Mackie, R.I., Raskin, L., 2001. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—II: Microbial population dynamics. *Water Res.* 35, 1804-1816.
- Meyer, B., Kuehl, J., Deutschbauer, A.M., Price, M.N., Arkin, A.P., Stahl, D.A., 2013. Variation among *Desulfovibrio* species in electron transfer systems used for

- syntrophic growth. *J. Bacteriol.* 195, 990-1004.
- Miksch, K., Kończak, B., 2012. Distribution of extracellular polymeric substances and their role in aerobic granule formation. *Chem. Process Eng.* 33, 679-688.
- Miller, T.L., Wolin, M.J., 1985. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch. Microbiol.* 141, 116-122.
- Moosbrugger, R., Wentzel, M., Ekama, G., 1992. Simple titration procedures to determine H₂CO₃ alkalinity and short-chain fatty acids in aqueous solutions containing known concentration sulphide weak acid/bases. *South African Res. Com. Rep.*
- Morgan, J.W., Evison, L.M., Forster, C.F., 1991. Upflow sludge blanket reactors: The effect of bio-supplements on performance and granulation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52, 243-255.
- Morita, M., Malvankar, N.S., Franks, A.E., Summers, Z.M., Giloteaux, L., Rotaru, A.E., Rotaru, C., Lovley, D.R., 2011. Potential for Direct Interspecies Electron Transfer in Methanogenic Wastewater Digester Aggregates. *MBio* 2, e00159-11.
- Morris, B.E.L., Henneberger, R., Huber, H., Moissl-Eichinger, C., 2013. Microbial syntrophy: Interaction for the common good. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 384-406.
- Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A.J.M., Plugge, C.M., 2010. Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: From genomes to reaction mechanisms. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 489-499.
- Mutombo, D.T., 2004. Internal Circulation Reactor Pushing the Limits, en: *Proceedings of the 2004 water institute of Southern Africa (WISA) biennial conference.* Cape Town, South Africa, p. 608–616.
- Muyzer, G., Stams, A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 441-454.
- Myers, R., Maniatis, T., Lerman, L.S., 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155, 501-527.
- Na, J.G., Lee, M.K., Yun, Y.M., Moon, C., Kim, M.S., Kim, D.H., 2016. Microbial community analysis of anaerobic granules in phenol-degrading UASB by next

- generation sequencing. *Biochem. Eng. J.* 112, 241-248.
- Nadais, H., Capela, I., Arroja, L., Duarte, A., 2005. Optimum cycle time for intermittent UASB reactors treating dairy wastewater. *Water Res.* 39, 1511-1518.
- Nakasaki, K., Kwon, S.H., Ikeda, H., 2013. Identification of microorganisms in the granules generated during methane fermentation of the syrup wastewater produced while canning fruit. *Process Biochem.* 48, 912-919.
- Narihiro, T., Terada, T., Kikuchi, K., Iguchi, A., Ikeda, M., Yamauchi, T., Shiraishi, K., Kamagata, Y., Nakamura, K., Sekiguchi, Y., 2009. Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing, high-strength organic wastewaters. *Microbes Environ.* 24, 88-96.
- Narihiro, T., Terada, T., Ohashi, A., Kamagata, Y., Nakamura, K., Sekiguchi, Y., 2012. Quantitative detection of previously characterized syntrophic bacteria in anaerobic wastewater treatment systems by sequence-specific rRNA cleavage method. *Water Res.* 46, 2167-2175.
- Nevin, K.P., Holmes, D.E., Woodard, T.L., Hinlein, E.S., Ostendorf, D.W., Lovley, D.R., 2005. *Geobacter bemidjiensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe(III)-reducing subsurface isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1667-1674.
- Nicolella, C., Nicoletta, C., Heijnen, J., Heijnen, J., 2000. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J. Biotechnol.* 80, 1-33.
- O'Flaherty, V., Lens, P.N.L., de Beer, D., Colleran, E., Lens, V.O.F.P.N.L., Colleran, D.D.B.E., O'Flaherty, V., Lens, P.N.L., De Beer, D., Colleran, E., 1997. Effect of feed composition and upflow velocity on aggregate characteristics in anaerobic upflow reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 102-107.
- O'Reilly, J., Chinalia, F.A., Mahony, T., Collins, G., Wu, J., O'Flaherty, V., 2009a. Cultivation of low-temperature (15 °C), anaerobic, wastewater treatment granules. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 421-426.
- O'Reilly, J., Lee, C., Chinalia, F., Collins, G., Mahony, T., O'Flaherty, V., 2010. Microbial community dynamics associated with biomass granulation in low-temperature (15 °C) anaerobic wastewater treatment bioreactors. *Bioresour. Technol.* 101, 6336-6344.

- O'Reilly, J., Lee, C., Collins, G., Chinalia, F., Mahony, T., O'Flaherty, V., 2009b. Quantitative and qualitative analysis of methanogenic communities in mesophilically and psychrophilically cultivated anaerobic granular biofilms. *Water Res.* 43, 3365-3374.
- Oktem, Y.A., Ince, O., Sallis, P., Donnelly, T., Ince, B.K., 2007. Anaerobic treatment of a chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater in a hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresour. Technol.* 99, 1089-1096.
- Ollivier, B.M., Mah, R.A., García, J.L., Robinson, R., 1985. Isolation and Characterization of *Methanogenium aggregans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 127-130.
- Oz, N.A., Ince, O., Turker, G., Ince, B.K., 2012. Effect of seed sludge microbial community and activity on the performance of anaerobic reactors during the start-up period. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 637-647.
- Ozgun, H., Dereli, R.K., Ersahin, M.E., Kinaci, C., Spanjers, H., van Lier, J.B., 2013. A review of anaerobic membrane bioreactors for municipal wastewater treatment: Integration options, limitations and expectations. *Sep. Purif. Technol.* 118, 89-104.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment – a critical review. *Crit. Rev. Environ. Control* 21, 411-490.
- Pereboom, J.H.F., 1994. Size distribution model for methanogenic granules from full scale UASB and IC reactors. *Water Sci. Technol.* 30, 211-221.
- Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J., Gaudin, C., 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a Cellulolytic, Mesophilic Species from Decayed Grass. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 155-159.
- Petta, L., De Gisi, S., Casella, P., Farina, R., Notarnicola, M., 2017. Evaluation of the treatability of a winery distillery (vinasse) wastewater by UASB, anoxic-aerobic UF-MBR and chemical precipitation/adsorption. *J. Environ. Manage.* 201, 177-189.
- Platen, H., Schink, B., 1987. Methanogenic degradation of acetone by an enrichment culture. *Arch Microbiol* 149, 136-141.
- Plugge, C.M., Grotenhuis, J.T.C., Stams, A.J.M., 1990. Isolation and Characterization of an Ethanol-Degrading Anaerobe from Methanogenic Granular Sludge, en: Bélaich, J., Bruschi, M., Garcia, J. (Eds.), *Microbiology and Biochemistry of*

- Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen Transfer. Federation of European Microbiological Societies Symposium Series. Springer, Boston, MA, pp. 439-440.
- Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2005. Syntrophism among *Clostridiales*, en: Duerre, P. (Ed.), Handbook on Clostridia. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, pp. 769–784.
- Puñal, A., Brauchi, S., Reyes, J.G., Chamy, R., 2003. Dynamics of extracellular polymeric substances in UASB and EGSB reactors treating medium and low concentrated wastewaters. *Water Sci. Technol.* 48, 41-49.
- Puyol, D., Mohedano, A.F., Sanz, J.L., Rodríguez, J.J., 2009. Comparison of UASB and EGSB performance on the anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol. *Chemosphere* 76, 1192-1198.
- Qiu, Y.L., Kuang, X.Z., Shi, X.S., Yuan, X.Z., Guo, R.B., 2014. *Paludibacter jiangxiensis* sp. nov., a strictly anaerobic, propionate-producing bacterium isolated from rice paddy field. *Arch. Microbiol.* 196, 149-155.
- Quarmby, J., Forster, C.F., 1995. A comparative study of the structure of thermophilic and mesophilic anaerobic granules. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 493-498.
- Rajeshwari, K., V, Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V.V., V.N., 2000. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 4, 135-156.
- Ramakrishnan, A., Gupta, S.K., 2006. Anaerobic biogranulation in a hybrid reactor treating phenolic waste. *J. Hazard. Mater.* 137, 1488-1495.
- Ramsay, I.R., Pullammanappallil, P.C., 2001. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: Derivation of Stoichiometry. *Biodegrad.* 12 12, 247–257.
- Ravi, R., Philip, L., Swaminathan, T., 2010. Comparison of biological reactors (biofilter, biotrickling filter and modified RBC) for treating dichloromethane vapors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 634-639.
- Razo-Flores, E., Hervé, M., Morier F., 2006. Application of biological treatment systems for chemical and petrochemical wastewater, en: Cervantes F.J. and Pavlostathis S.G. (Ed.), *Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters*. IWA, Londres, pp. 267-297.

- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Alonso-Gutierrez, J., Stams, A.J.M., Lema, J.M., Carballa, M., 2012. Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiol. Res.* 167, 581-589.
- Rene, E.R., Veiga, M.C., Kennes, C., 2013. Bioreactors for Air Pollution Control, en: Kennes, C., Veiga, M.C. (Eds.), *Air Pollution Prevention and Control: Bioreactors and Bioenergy*. Wiley, pp. 57-243.
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L., 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill, London, UK.
- Rizvi, H., Ahmad, N., Abbas, F., Bukhari, I.H., Yasar, A., Ali, S., Yasmeen, T., Riaz, M., 2014. Start-up of UASB reactors treating municipal wastewater and effect of temperature/sludge age and hydraulic retention time (HRT) on its performance. *Arab. J. Chem.*
- Romero-Güiza, M.S., Vila, J., Mata-Alvarez, J., Chimenos, J.M., Astals, S., 2016. The role of additives on anaerobic digestion: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 58, 1486-1499.
- Rotaru, A.E., Shrestha, P.M., Liu, F., Shrestha, M., Shrestha, D., Embree, M., Zengler, K., Wardman, C., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2014. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy Environ. Sci.* 7, 408-415.
- Roussy, J., van Vooren, M., Guibal, E., 2004. Chitosan for the coagulation and flocculation of mineral colloids. *J. Dispers. Sci. Technol.* 25, 663-677.
- Sam-soon, P., Loewenthal, R.E., Dold, P.L., Marais, G.R., 1987. Hypothesis for pelletisation in the upflow anaerobic sludge bed reactor. *Water SA* 13, 69-80.
- San Valero, P., 2016. Modelación del proceso de biofiltro percolador para el tratamiento de emisiones en aire de compuestos orgánicos volátiles de elevada solubilidad en agua. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Sánchez, J., Hidalgo, M., Salvado, V., 2007. Valora: a PC program for the self-learning of acid base titration. 1st Int. Technol. Educ. Dev. Conf.
- Sander, R., 1999. Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry. Database 20, 107.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- Satoh, H., Miura, Y., Tsushima, I., Okabe, S., 2007. Layered structure of bacterial and archaeal communities and their in situ activities in anaerobic granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7300-7307.
- Sayed, S.K.I., 1987. Anaerobic treatment of slaughterhouse waste-water using the UASB proces. Agricultural University, Wageningen.
- Schink, B., 2006. The Genus *Pelobacter*, en: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass*. Springer New York, New York, NY, pp. 5-11.
- Schink, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 262-280.
- Schink, B., 1984. Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov., and evidence for propionate formation from C2 compounds. *Arch Microbiol* 137, 33-41.
- Schink, B., Kremer, D.R., Hansen, T.A., 1987. Pathway of propionate formation from ethanol in *Pelobacter propionicus*. *Arch. Microbiol.* 147, 321-327.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K., 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 229-246.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K., 1995. Interspecies electron transfer during propionate and butyrate degradation in mesophilic, granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2765-2767.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K., 1994. Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 457-462.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K., 1993. Effects of magnesium on thermophilic acetate-degrading granules in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 304-310.
- Schnürer, A., Nordberg, Å., 2008. Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Sci. Technol.* 57, 735-740.

- Schramm, E., Schink, B., 1991. Ether-cleaving enzyme and diol dehydratase involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by a new *Acetobacterium* sp. *Biodegradation* 2, 71-79.
- Scully, C., Collins, G., O'Flaherty, V., 2006. Anaerobic biological treatment of phenol at 9.5-15 °C in an expanded granular sludge bed (EGSB)-based bioreactor. *Water Res.* 40, 3737-3744.
- Seghezzi, L., 2004. Anaerobic treatment of domestic wastewater in subtropical regions. PhD Thesis. Agricultural University of Wageningen.
- Sempere, F., Martínez-Soria, V., Peña-roja, J.M., Waalkens, A., Gabaldón, C., 2012. Control of VOC emissions from a flexographic printing facility using an industrial biotrickling filter. *Water Sci. Technol.* 65, 177-182.
- Seviour, T., Yuan, Z., van Loosdrecht, M.C.M., Lin, Y., 2012. Aerobic sludge granulation: A tale of two polysaccharides? *Water Res.* 46, 4803-4813.
- She, Z., Zhu, Y., Li, L., Xie, T., Wang, L., Huang, J., 2012. Granulation of sludge in anaerobic baffled reactor with inert carrier under room temperature. *Proc. - 2012 3rd Int. Conf. Digit. Manuf. Autom. ICDMA 2012* 450-453.
- Shelobolina, E.S., Vrionis, H.A., Findlay, R.H., Lovley, D.R., 2008. *Geobacter uraniireducens* sp. nov., isolated from subsurface sediment undergoing uranium bioremediation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1075-1078.
- Shen, L., Zhao, Q., Wu, X., Li, X., Li, Q., Wang, Y., 2016. Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 54, 1358-1367.
- Sheng, G.P., Yu, H.Q., Li, X.Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882-894.
- Shigematsu, T., Tang, Y., Kobayashi, T., 2004. Effect of dilution rate on metabolic pathway shift between acetoclastic and nonacetoclastic. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4048-4052.
- Show, K., 2006. Chapter 2. Factors Affecting Anaerobic Granulation, en: Tay, J.-H., Tay, S.T.-L., Liu, Y., Show, K.-Y., Ivanov, V. (Eds.), *Biogranulation Technologies for Wastewater Treatment*. Elsevier, pp. 35-56.
- Show, K.Y., Tay, J.H., Hung, Y.-T., 2010. Global Perspective of Anaerobic Treatment of Industrial Wastewater, en: Wang, L.K., Tay, J.-H., Tay, S.T.L., Hung, Y.-T.

- (Eds.), Environmental Bioengineering: Volume 11. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 773-807.
- Show, K.Y., Wang, Y., Foong, S.F., Tay, J.H., 2004. Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Res.* 38, 2292-2303.
- Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Werner, J.J., Franks, A.E., Elena-Rotaru, A., Shrestha, M., Liu, F., Nevin, K.P., Angenent, L.T., Lovley, D.R., 2014. Correlation between microbial community and granule conductivity in anaerobic bioreactors for brewery wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 174, 306-310.
- Sieber, J.R., McInerney, M.J., Gunsalus, R.P., 2012. Genomic Insights into Syntrophy: The Paradigm for Anaerobic Metabolic Cooperation. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 429-452.
- Siggins, A., Enright, A.M., O'Flaherty, V., 2011a. Methanogenic community development in anaerobic granular bioreactors treating trichloroethylene (TCE)-contaminated wastewater at 37 °C and 15 °C. *Water Res.* 45, 2452-2462.
- Siggins, A., Enright, A.M., O'Flaherty, V., 2011b. Temperature dependent (37-15 °C) anaerobic digestion of a trichloroethylene-contaminated wastewater. *Bioresour. Technol.* 102, 7645-7656.
- Singh, R.P., Kumar, S., Ojha, C.S.P., 1999. Nutrient requirement for UASB process: A review. *Biochem. Eng. J.* 3, 35-54.
- Smith, K.S., Ingram-Smith, C., 2007. *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol.* 15, 150-155.
- Sobeck, D.C., Higgins, M.J., 2002. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Res.* 36, 527-538.
- Solera del Río, R., 2014. Aspectos biológicos de la digestión anaeróbica II.2. Grupo Mundi Prensa, Madrid.
- Song, G., Xi, H., Zhou, Y., Fu, L., Xing, X., Wu, C., 2017. Influence of organic load rate (OLR) on the hydrolytic acidification of 2-butenal manufacture wastewater and analysis of bacterial community structure. *Bioresour. Technol.* 243, 502-511.
- Song, M., Shin, S.G., Hwang, S., 2010. Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge

- blanket treating swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 101.
- Speece, R.E., McCarty, P., 1964. Nutrient Requirements and Biological Solids Accumulation in Anaerobic Digestion, *Advances in Water Pollution Research*. PERGAMON PRESS LTD.
- Speranza, G., Mueller, B., Orlandi, M., Morelli, C.F., Manitto, P., Schink, B., 2002. Mechanism of Anaerobic Ether Cleavage. *J. Biol. Chem.* 277, 11684-11690.
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T., 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 115-122.
- Sponza, D.T., 2002. Simultaneous granulation, biomass retainment and carbon tetrachloride (CT) removal in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Process Biochem.* 37, 1091-1101.
- Stams, A., 1994. Metabolic Interactions Between Anaerobic-Bacteria in Methanogenic Environments. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 66, 271-294.
- Stams, A.J.M., Dijkema, C., Boone, D.R., 2001. Pathway of Propionate Oxidation by a Syntrophic Culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1800-1804.
- Stams, A.J.M., Plugge, C.M., 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 568-577.
- Stams, A.J.M., Sousa, D.Z., Kleerebezem, R., Plugge, C.M., 2012. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. *Water Sci. Technol.* 66, 352-362.
- Stieb, M., Schink, B., 1985. Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. *Arch. Microbiol.* 140, 387-390.
- Strand, S.P., Vårum, K.M., Østgaard, K., 2003. Interactions between chitosans and bacterial suspensions: Adsorption and flocculation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 27, 71-81.
- Sudmalis, D., Gagliano, M.C., Pei, R., Grolle, K., Plugge, C.M., Rijnaarts, H.H.M., Zeeman, G., Temmink, H., 2018. Fast anaerobic sludge granulation at elevated salinity. *Water Res.* 128, 293-303.

- Sutherland, I.W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3-9.
- Svojitka, J., Dvořák, L., Studer, M., Straub, J.O., Frömelt, H., Wintgens, T., 2017. Performance of an anaerobic membrane bioreactor for pharmaceutical wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 229, 180-189.
- Syutsubo, K., Harada, H., Ohashi, A., Suzuki, H., 1997. An effective start-up of thermophilic UASB reactor by seeding mesophilically-grown granular sludge. *Water Sci. Technol.* 36, 391-398.
- Takei, T., Ikeda, K., Ijima, H., Kawakami, K., 2011. Fabrication of poly(vinyl alcohol) hydrogel beads crosslinked using sodium sulfate for microorganism immobilization. *Process Biochem.* 46, 566-571.
- Tay, J.-H., Show, K., Lee, D.-J., Zhang, Z., 2010. Anaerobic Granulation and Granular Sludge Bed Reactor Systems, en: Fang, H.H.P. (Ed.), *Environmental Anaerobic Technology. Applications and New Developments*. Imperial College Press, London, pp. 113-131.
- Tay, J.-H., Xu, H.-L., Teo, K.-C., 2000. Molecular Mechanism of Granulation. I: H⁺ Translocation-Dehydration Theory. *J. Environ. Eng.* 126, 403-410.
- Tay, J., Yan, Y., 1996. Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Environ. Res.* 68, 1140-1150.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D., Metcalf & Eddy, I., 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4.a ed. McGraw-Hill.
- Teo, K., Xu, H., Tay, J., 2000. Molecular Mechanism of Granulation. II: Protontranslocating activity. *J. Environ. Eng.* 126, 411-418.
- Tauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100-180.
- Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B., Vandermeren, P., Verstraete, W., 1995a. Granulation and Sludge Bed Stability in Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactors in Relation to Surface Thermodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3681-3686.
- Thaveesri, J., Liessens, B., Verstraete, W., 1995b. Granular sludge growth under different reactor liquid surface tensions in lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactors treating wastewater from sugar-beet processing. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol. 43, 1122-1127.
- Thiele, J.H., Zeikus, J.G., 1988. Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic Digestion: Significance of Formate Transfer versus Hydrogen Transfer during Syntrophic Methanogenesis in Flocs. Appl. Environ. Microbiol. 54, 20-29.
- Tiwari, M.K., Guha, S., Harendranath, C.S., Tripathi, S., 2006. Influence of extrinsic factors on granulation in UASB reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 145-154.
- Tonouchi, A., 2004. Anaerobic 2-propanol degradation in anoxic paddy soil and the possible role of methanogens in its degradation. Curr. Microbiol. 49, 75-8.
- Tsushima, I., Yoochatchaval, W., Yoshida, H., Araki, N., Syutsubo, K., 2010. Microbial community structure and population dynamics of granules developed in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors for the anaerobic treatment of low-strength wastewater at low temperature. J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng. 45, 754-766.
- Ueki, A., Akasaka, H., Suzuki, D., Ueki, K., 2006. *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 39-44.
- USEPA, 2014. United States Environmental Protection Agency. Health Risk and Exposure Assessment for Ozone First External Review Draft. North Carolina.
- Uyanik, S., Sallis, P.J., Anderson, G.K., 2002. The effect of polymer addition on granulation in an anaerobic baffled reactor (ABR). Part I: process performance. Water Res. 36, 933-943.
- van Groenestijn, J.W., Kraakman, N.J.R., 2005. Recent developments in biological waste gas purification in Europe. Chem. Eng. J. 113, 85-91.
- van Haandel, A.C., Lettinga, G., 1994. Anaerobic Sewage Treatment: a Practical Guide for Regions with a Hot Climate. J. Wiley, Chichester, UK.
- van Lier, J.B., 2008. High-rate anaerobic wastewater treatment: Diversifying from end-of-the-pipe treatment to resource-oriented conversion techniques. Water Sci. Technol. 57, 1137-1148.
- van Lier, J.B., Mahmoud, N., Zeeman, G., 2008. Anaerobic Wastewater Treatment, Biological Wastewater Treatment : Principles, Modelling and Design. IWA

Publishing, London, UK.

- van Lier, J.B., Tilche, A., Ahring, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Pol, L.W., Lens, P., Verstraete, W., 2001. New perspectives in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 43, 1-18.
- van Lier, J.B., Zee, F.P., Frijters, C.T.M.J., Ersahin, M.E., 2015. Celebrating 40 years anaerobic sludge bed reactors for industrial wastewater treatment. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 14, 681-702.
- Vavilin, V.A., Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X., 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Manag.* 28, 939-951.
- Veldkamp, H., 1960. Isolation and characteristics of *Treponema zuelzeriae* nov. spec., an anaerobic, free-living spirochete. *Antonie van Leeuwenhoek* 26, 103-125.
- Vermorel, N., 2017. Anaerobic biodegradation of solvents from the packaging industry: study and enhancement. PhD Thesis. Universitat de València.
- Vermorel, N., San-Valero, P., Izquierdo, M., Gabaldón, C., Peña-roja, J.M., 2017. Anaerobic degradation of 2-propanol: Laboratory and pilot-scale studies. *Chem. Eng. Sci.* 172, 42-51.
- Vlyssides, A., Barampouti, E.M., Mai, S., 2009. Influence of ferrous iron on the granularity of a UASB reactor. *Chem. Eng. J.* 146, 49-56.
- Vlyssides, A., Barampouti, E.M., Mai, S., 2008. Granulation mechanism of a UASB reactor supplemented with iron. *Anaerobe* 14, 275-279.
- Waalkens, A., Gabaldón, C., Peña-roja, J.M.& Álvarez-Hornos, F.J., 2015. Procedimiento para la depuración de gases que contienen compuestos orgánicos volátiles.
- Walker, C.B., He, Z., Yang, Z.K., Ringbauer, J.A., He, Q., Zhou, J., Voordouw, G., Wall, J.D., Arkin, A.P., Hazen, T.C., Stolyar, S., Stahl, D.A., 2009. The electron transfer system of syntrophically grown *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Bacteriol.* 191, 5793-5801.
- Wang, H., Tao, Y., Gao, D., Liu, G., Chen, C., Ren, N., van Lier, J.B., de Kreuk, M., 2015. Microbial population dynamics in response to increasing loadings of pre-hydrolyzed pig manure in an expanded granular sludge bed. *Water Res.* 87, 29-37.

- Wenjie, Z., Dunqiu, W., Yasunori, K., Taichi, Y., Li, Z., Kenji, F., 2008. PVA-gel beads enhance granule formation in a UASB reactor. *Bioresour. Technol.* 99, 8400-8405.
- Westerholm, M., Dolfig, J., Sherry, A., Gray, N.D., Head, I.M., Schnürer, A., 2011. Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 500-505.
- Westerholm, M., Moestedt, J., Schnürer, A., 2016. Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Appl. Energy* 179, 124-135.
- White, G.F., Russell, N.J., Tidswell, E.C., 1996. Bacterial scission of ether bonds. *Microbiol. Rev.* 60, 216-232.
- WHO, 2016. Ambient Air Pollution: A global assessment of exposure and burden of disease, World Health Organization.
- WHO Regional Office for Europe, 2008. Health risks of ozone from long-range transboundary air pollution. Copenhagen, Denmark.
- Widdel, F., 1986. Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1056-1062.
- Widdel, F., Rouvière, P.E., Wolfe, R.S., 1988. Classification of secondary alcohol-utilizing methanogens including a new thermophilic isolate. *Arch. Microbiol.* 150, 477-481.
- Wiegant, W.M., 1987. The 'spaghetti theory' on anaerobic sludge formation, or the inevitability of granulation, en: Lettinga, G., A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis, Hulshoff Pol, L.W. (Eds.), *Granular Anaerobic Sludge, Microbiology and technology*. The Netherlands: Pudoc. Wageningen, pp. 146-152.
- Willems, A., Collins, M.D., 1996. Phylogenetic relationships of the genera *Acetobacterium* and *Eubacterium* sensu stricto and reclassification of *Eubacterium alactolyticum* as *Pseudoramibacter alactolyticus* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1083-1087.
- Wilschut, J., Hoekstra, D., 1984. Membrane fusion: from liposomes to biological membranes. *Trends Biotechnol. Sci.* 9, 479-483.
- Wimpenny, J., Colasanti, R., 1997. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol. Ecol.*

22, 1-16.

- Xiao, F., Yang, S.F., Li, X.Y., 2008. Physical and hydrodynamic properties of aerobic granules produced in sequencing batch reactors. *Sep. Purif. Technol.* 63, 634-641.
- Xing, L., Yang, S., Yin, Q., Xie, S., Strong, P.J., Wu, G., 2017. Effects of carbon source on methanogenic activities and pathways incorporating metagenomic analysis of microbial community. *Bioresour. Technol.* 244, 982-988.
- Xing, W., Zuo, J.E., Dai, N., Cheng, J., Li, J., 2009. Reactor performance and microbial community of an EGSB reactor operated at 20 and 15 °C. *J. Appl. Microbiol.* 107, 848-857.
- Xu, F., Miao, H.F., Huang, Z.X., Ren, H.Y., Zhao, M.X., Ruan, W.Q., 2013. Performance and dynamic characteristics of microbial communities in an internal circulation reactor for treating brewery wastewater. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 34, 2885-2892.
- Xun, L., Boone, D.R., Mah, R.A., 1989. Deoxyribonucleic Acid Hybridization Study of *Methanogenium* and *Methanocorpusculum* species, Emendation of the Genus *Methanocorpusculum* and Transfer of *Methanogenium aggregans* to the Genus *Methanocorpusculum* as *Methanocorpusculum aggregans* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 109-111.
- Yan, Y.-G., Tay, J.-H., 1996. Brewery Wastewater Treatment in UASB Reactor at Ambient Temperature. *J. Environ. Eng.* 122, 550-553.
- Yang, G., Anderson, G.K., 1994. Effects of Wastewater Composition on Stability of UASB. *J. Environ. Eng.* 119, 958-977.
- Yang, R., Li, H., Huang, M., Yang, H., Li, A., 2016. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. *Water Res.* 95, 59-89.
- Yanti, H., Wikandari, R., Millati, R., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2014. Effect of ester compounds on biogas production: beneficial or detrimental? *Energy Sci. Eng.* 2, 22-30.
- Yoda, M., Kitagawa, M., Miyaji, Y., 1989. Granular sludge formation in the anaerobic expanded microcarrier bed process. *Water Sci. Technol.* 21, 109-120.
- Yu, H., Gu, G., 1996. Biomethanation of brewery wastewater using an anaerobic upflow blanket filter. *J. Clean. Prod.* 4, 219-223.

- Yu, H.Q., Fang, H.H.P., Tay, J.H., 2001a. Enhanced sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by aluminum chloride. *Chemosphere* 44, 31-36.
- Yu, H.Q., Tay, J.H., Fang, H.H.P., 2001b. The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Res.* 35, 1052-1060.
- Yu, H.Q., Tay, J.H., Fang, H.H.P., 1999. Effects of Added Powdered and Granular Activated Carbons on Start-Up Performance of UASB Reactors. *Environ. Technol.* 20, 1095-1101.
- Yuan, D.Q., Wang, Y.L., Feng, J., 2014. Contribution of stratified extracellular polymeric substances to the gel-like and fractal structures of activated sludge. *Water Res.* 56, 56-65.
- Zain, N.A.M., Suhaimi, M.S., Idris, A., 2011. Development and modification of PVA-alginate as a suitable immobilization matrix. *Process Biochem.* 46, 2122-2129.
- Zandvoort, M.H., van Hullebusch, E.D., Feroso, F.G., Lens, P.N.L., 2006. Trace metals in anaerobic granular sludge reactors: Bioavailability and dosing strategies. *Eng. Life Sci.* 6, 293-301.
- Zealand, A.M., Roskilly, A.P., Graham, D.W., 2017. Effect of feeding frequency and organic loading rate on biomethane production in the anaerobic digestion of rice straw. *Appl. Energy* 1-10.
- Zellner, G., Alten, C., Stackebrandt, E., Conway de Macario, E., Winter, J., 1987. Isolation and characterization of *Methanocorpusculum parvum*, gen. nov., spec. nov., a new tungsten requiring, coccoid methanogen. *Arch. Microbiol.* 147, 13-20.
- Zellner, G., Winter, J., 1987. Secondary alcohols as hydrogen donors for CO₂-reduction by methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 44, 323-328.
- Zhang, H., Banaszak, J.E., Parameswaran, P., Alder, J., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., 2009. Focused-Pulsed sludge pre-treatment increases the bacterial diversity and relative abundance of acetoclastic methanogens in a full-scale anaerobic digester. *Water Res.* 43, 4517-4526.
- Zhang, L., De Vrieze, J., Hendrickx, T.L.G., Wei, W., Temmink, H., Rijnaarts, H., Zeeman, G., 2018. Anaerobic treatment of raw domestic wastewater in a UASB-digester at 10 °C and microbial community dynamics. *Chem. Eng. J.* 334, 2088-2097.

- Zhang, L., Feng, X., Zhu, N., Chen, J., 2007. Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 551-557.
- Zhao, H., Li, J., Li, J., Yuan, X., Piao, R., Zhu, W., Li, H., Wang, X., Cui, Z., 2013. Organic loading rate shock impact on operation and microbial communities in different anaerobic fixed-bed reactors. *Bioresour. Technol.* 140, 211-219.
- Zhao, Y., Boone, D.R., Mah, R. a., Boone, J.E., Xun, L., 1989. Isolation and Characterization of *Methanocorpusculum labreanum* sp. nov. from the LaBrea Tar Pits. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 10-13.
- Zhao, Z., Zhang, Y., Yu, Q., Dang, Y., Li, Y., Quan, X., 2016. Communities stimulated with ethanol to perform direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate. *Water Res.* 102, 475-484.
- Zhen, G.Y., Lu, X.Q., Li, Y.Y., Zhao, Y.C., 2013. Innovative combination of electrolysis and Fe(II)-activated persulfate oxidation for improving the dewaterability of waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 136, 664-663.
- Zheng, D., Angenent, L.T., Raskin, L., 2006. Monitoring Granule Formation in Anaerobic Upflow Bioreactors Using Oligonucleotide Hybridization Probes. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 458-472.
- Zhou, W., Imai, T., Ukita, M., Li, F., Yuasa, A., 2007. Effect of loading rate on the granulation process and granular activity in a bench scale UASB reactor. *Bioresour. Technol.* 98, 1386-1392.
- Zhou, W., Imai, T., Ukita, M., Sekine, M., Higuchi, T., 2006. Triggering forces for anaerobic granulation in UASB reactors. *Process Biochem.* 41, 36-43.
- Zhu, J., Hu, J., Gu, X., 1997. The bacterial numeration and an observation of a new syntrophic association for granular sludge. *Water Sci. Technol.* 36, 133-140.
- Zhu, L., Lv, M. Le, Dai, X., Yu, Y.W., Qi, H.Y., Xu, X.Y., 2012. Role and significance of extracellular polymeric substances on the property of aerobic granule. *Bioresour. Technol.* 107, 46-54.
- Zinder, S.H., 1993. Physiological Ecology of Methanogens, en: Ferry, J.G. (Ed.), *Methanogenesis*. Chapman & Hall Microbiology Series (Physiology/Ecology/Molecular Biology/Biotechnology). Springer, Boston, MA, pp. 128-206.
- Zoutberg, G.R., De Been, P., 1997. The Biobed® EGSB (Expanded Granular Sludge

Bed) system covers shortcomings of the Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor in the chemical industry. *Water Sci. Technol.* 35, 183-188.