



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

# PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN

Trabajo Final de Máster  
Máster Ingeniería Ambiental

**CAMINOS**  
upv **MÁSTER  
EN INGENIERÍA  
AMBIENTAL**



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS DE CAMINOS,  
CANALES Y PUERTOS

Directoras:  
Paula Marzal Doménech  
M.<sup>a</sup> Carmen Gabaldón García  
septiembre 2018  
Emilio José Cano Myllymäki  
Autor:

## Índice

1.	Introducción .....	7
1.1.	Tratamiento anaerobio de aguas residuales.....	7
1.2.	Reactores anaerobios.....	11
1.3.	Procesos de granulación en reactores anaerobios .....	14
1.3.1.	Factores que afectan al proceso de granulación .....	15
1.3.2.	Influencia de la adición de Chitosán en el proceso de granulación .....	19
1.3.3.	Procesos de granulación de la biomasa en reactores RAFA.....	22
1.3.4.	Procesos de granulación de la biomasa en reactores RALF .....	23
2.	Objetivos .....	25
2.1.	Objetivo general.....	25
2.2.	Objetivos específicos.....	25
3.	Material y Métodos.....	26
3.1.	Montaje experimental.....	26
3.2.	Inóculo.....	31
3.3.	Composición del agua residual sintética .....	32
3.4.	Métodos analíticos.....	36
3.4.1.	Determinación del pH y la conductividad .....	36
3.4.2.	Determinación de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles.....	36
3.4.3.	Determinación de la DQO .....	36
3.4.4.	Determinación de los disolventes orgánicos .....	37
3.4.5.	Determinación del caudal de metano .....	37
3.4.6.	Determinación de la composición del biogás .....	38
3.4.7.	Determinación de la sedimentabilidad del fango inóculo .....	38
3.4.8.	Medida de la turbidez .....	38
3.4.9.	Determinación de la concentración de sólidos .....	38
3.4.10.	Distribución del tamaño de partícula del fango.....	39
3.4.11.	Ensayo de la actividad metanogénica específica .....	40
4.	Procedimiento Experimental.....	41
4.1.	Determinación de la dosis óptima de Chitosán .....	41
4.2.	Seguimiento del proceso de granulación y la operación de los reactores.....	43
5.	Resultados y Discusión .....	47
5.1.	Ensayo de Jar-Test.....	47

5.2.	Puesta en marcha y operación de los reactores .....	50
5.2.1.	Carga orgánica aplicada y Ácidos Grasos Volátiles .....	50
5.2.2.	Eficacia de eliminación .....	52
5.2.3.	pH, Alcalinidad y Conductividad.....	56
5.2.4.	Producción de Metano .....	58
5.2.5.	Capacidad de retención del fango.....	64
5.3.	Adición del Chitosán en el proceso de granulación .....	68
5.3.1.	Evolución del tamaño de partícula del fango.....	68
5.4.	Actividad Metanogénica Específica (AME).....	73
6.	Conclusiones.....	77
7.	Bibliografía .....	79

## Índice de Tablas

Tabla 1 Características del inóculo .....	32
Tabla 2 Formulación de la composición de la alimentación .....	32
Tabla 3 Solución concentrada de Macronutrientes .....	33
Tabla 4 Ejemplo de adición de Macronutrientes .....	33
Tabla 5 Solución (SIn) concentrada de Calcio y Magnesio .....	33
Tabla 6 Ejemplo de adición de Calcio y Magnesio .....	34
Tabla 7 Solución concentrada de Micronutrientes .....	34
Tabla 8 Ejemplo de adición de Micronutrientes .....	35
Tabla 9 Concentración requerida de Alcalinidad .....	35
Tabla 10 Concentración requerida de Levadura .....	35
Tabla 11 Ejemplo de adición de la Levadura .....	36
Tabla 12 Condiciones iniciales de los reactores .....	44
Tabla 13 Parámetros de operación de los reactores. ( $Q_E$ : Caudal de entrada).....	44
Tabla 14 Analíticas realizadas de los reactores RAFA y RALF.....	46
Tabla 15 Dosis de Chitosán a cada vaso .....	47
Tabla 16 Dosis de Chitosán de los tres últimos vasos .....	47
Tabla 17 Concentración de sustrato durante el periodo de funcionamiento de los rectores RAFA y RALF.....	54
Tabla 18 Media aritmética y desviación estándar del pH, Conductividad y Alcalinidad de los reactores .....	56
Tabla 19 Diámetro medio y porcentaje de partículas mayores a 300 $\mu\text{m}$ .....	71

## Índice de Ilustraciones

Ilustración 1 Transformación que tienen lugar en el proceso de digestión anaerobia. Adaptada de (Grady, Daigger, & Lim, 1999).....	8
Ilustración 2 Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (RAFA) (Nicolella, 2000).....	12
Ilustración 3 Reactor Anaerobio de Lecho Fluidizado (RALF) (Van Der Berg, 1986).....	12
Ilustración 4 Las estructuras químicas del Chitosán (a) y su quitina precursora (b).....	20
Ilustración 5 Montaje experimental a escala de laboratorio del reactor RAFA y RALF .....	26
Ilustración 6 Esquema de montaje experimental del reactor RAFA (UASB).....	27
Ilustración 7 Esquema de montaje del reactor RALF (EGSB) .....	28
Ilustración 8 Bombas de entrada de nutrientes. Bomba de color rojo corresponde a RAFA. Bomba arriba a la izquierda entrada de RALF y bomba abajo a la izquierda recirculación de RALF.....	29
Ilustración 9 Bomba de entrada de sustrato orgánico. Mezcla de disolventes en las botellas ..	29
Ilustración 10 Tanque de nutrientes (Azul).....	30
Ilustración 11 Salida del biogás .....	31
Ilustración 12 BioProcess (arriba) y Rigamo (abajo) para la medida del caudal de metano .....	37
Ilustración 13 Ensayo de actividad metanogénica .....	40
Ilustración 14 Ensayo de Jar-Test.....	41
Ilustración 15 Ensayo Jar-Test con fango .....	42
Ilustración 16 Conos Imhoff con fango decantado .....	43
Ilustración 17 Vaso 6 de ensayo Jar-Test .....	48
Ilustración 18 Vasos 7,8 y 9 del ensayo Jar-Test .....	48
Ilustración 19 Fotos de los gránulos dentro de los reactores en el día 42 (arriba: Lecho; Abajo: Flotantes; Izquierda: Reactor RAFA; Derecha: Reactor RALF) .....	72

## Índice de Graficas

Grafica 1 Evolución de la carga orgánica y sus fases para reactor RAFA .....	45
Grafica 2 Evolución de la carga orgánica y sus fases para reactor RALF.....	45
Grafica 3 IVF, Turbidez por cada dosis de Chitosán .....	49
Grafica 4 Sólidos suspendidos totales por cada dosis de Chitosán.....	49
Grafica 5 Carga orgánica vs Ácidos Grasos Volátiles (RAFA).....	51
Grafica 6 Carga Orgánica vs Ácidos Grasos Volátiles (RALF).....	51
Grafica 7 Carga Orgánica vs Eficacia de Eliminación (RAFA).....	52
Grafica 8 Carga Orgánica vs Eficacia de Eliminación (RALF).....	53
Grafica 9 Evolución de la eliminación de 1-etoxi-2-propanol (RAFA).....	55
Grafica 10 Evolución de la eliminación de 1-etoxi-2-propanol (RALF).....	56
Grafica 11 Caudal de metano durante el tiempo de funcionamiento del reactor RAFA.....	58
Grafica 12 Rendimiento de metano durante el tiempo de funcionamiento del reactor RAFA ..	59
Grafica 13 Temperatura en el reactor RAFA .....	60
Grafica 14 Caudal de metano durante el tiempo de funcionamiento del reactor RALF.....	61
Grafica 15 Rendimiento de metano durante el tiempo de funcionamiento del reactor RALF...	62
Grafica 16 Temperatura en reactor RALF.....	63
Grafica 17 Metano disuelto en los reactores RAFA y RALF en el día 94 de funcionamiento.....	64
Grafica 18 Sólidos suspendidos volátiles del reactor RAFA .....	65
Grafica 19 Sólidos suspendidos volátiles del reactor RALF .....	66
Grafica 20 Evolución de los sólidos dentro del reactor RAFA en el día 82.....	67
Grafica 21 Evolución de los sólidos dentro del reactor RALF en el día 82 .....	67
Grafica 22 Evolución de la distribución del tamaño de partícula durante el tiempo de funcionamiento del reactor RAFA.....	69
Grafica 23 Evolución de la distribución del tamaño de partícula durante el tiempo de funcionamiento del reactor RALF.....	69
Grafica 24 Distribución del tamaño de partícula del reactor RAFA .....	70
Grafica 25 Destrucción del tamaño de partícula del reactor RALF .....	70
Grafica 26 Actividad metanogénica antes de inocularse en los reactores .....	73
Grafica 27 Actividad metanogénica tras el funcionamiento del reactor RAFA.....	74
Grafica 28 Actividad metanogénica tras el funcionamiento del reactor RALF .....	75

## Índice de Esquemas

Esquema 1 Simplificación de las transformaciones que tienen lugar durante el proceso de digestión anaerobia.....	10
---	----

## 1. Introducción

Una de las mayores problemáticas ambientales actual y a nivel mundial es la contaminación de las aguas, el problema va más allá de la sola presencia de contaminantes, si no que algunos de ellos provocan daños irremediables en la cadena trófica y a los demás subsistemas ambientales.

Uno de los principales problemas es el causado por los vertidos industriales, contaminación que se puede atenuar gracias a los tratamientos de agua y a la mejora de la ciencia y la investigación.

Como tecnología pionera en el sector, existen reactores anaerobios para el tratamiento de agua residual industrial, como los reactores de lecho granular, conocidos como los reactores anaerobios de flujo ascendentes (RAFA o UASB en inglés) y los reactores anaerobios de lecho fluidizado (RALF o EGSB en inglés) para facilitar el requisito de formación de gránulos mediante la agregación y la adhesión de la microbiota.

Uno de los principales problemas de los reactores anaerobios es el lento crecimiento de la población microbiológica y la formación de gránulos necesario para lograr elevadas eficacias de eliminación de contaminantes, pero para ello existen unos polímeros sintéticos que puede mejorar la granulación del fango reduciendo los tiempos de arranque de estos sistemas.

En este trabajo se estudiará el efecto del floculante conocido como Chitosán sobre la granulación del fango, en un proceso con alimentación intermitente de agua residual contaminada con disolventes orgánicos, durante 16 horas al día, los 7 días de la semana, descansando 8 horas diarias para simular un proceso industrial. Se pretende comprobar el efecto del Chitosán sobre calidad del fango granular obtenido, que conlleve posteriormente la reducción de los tiempos de arranque de los reactores para su puesta en marcha y así consiga la eliminación intermitente de disolventes orgánicos.

Este polímero se añadirá a razón de una vez por semana y con una cantidad idéntica en cada uno de los dos reactores, utilizadas en el estudio para comparar su efecto en ellos.

### 1.1. Tratamiento anaerobio de aguas residuales

El tratamiento anaerobio ha acompañado a la depuración de las aguas residuales desde sus inicios, situándose su punto inicial en la concepción de los tanques sépticos que se utilizaron ampliamente en el siglo XX. Este tipo de tanque fue descrito por primera vez en 1857 y definido como uno de “los más grandes inventos modernos”. En gran medida así lo fue hasta el desarrollo de los diferentes sistemas de depuración, tanto aerobios como anaerobios, para el tratamiento de aguas residuales (Seghezzeo, Zeeman, Liel, Hamelers, & y Lettinga, 1998).

El tratamiento anaerobio se desarrolló progresivamente como paliativo para el gran consumo energético que se produce en el tratamiento aerobio y, actualmente, se presenta como el

método por excelencia “para la protección del medio ambiente y la conservación de recursos” (Seghezze et al., 1998).

La digestión anaerobia es un proceso microbiológico complejo que se realiza en ausencia de oxígeno, donde la materia orgánica se transforma a biomasa y compuestos orgánicos, la mayoría de ellos volátiles. Aunque es un proceso natural, sólo en los últimos veinticinco años ha llegado a ser una tecnología competitiva en comparación con otras alternativas. Esto ha sido posible gracias a la implementación de sistemas que separan el tiempo de retención hidráulico (TRH), del tiempo de retención celular (TRC) los cuales han sido denominados reactores de alta tasa. Durante este proceso también se obtiene un gas combustible (Biogás) y lodos con propiedades adecuadas para ser usados como abonos. (Bermúdez, Rodríguez, Martínez, & Terry, 2011).

Los procesos que tienen lugar en la digestión anaerobia se muestran en la Ilustración 1:

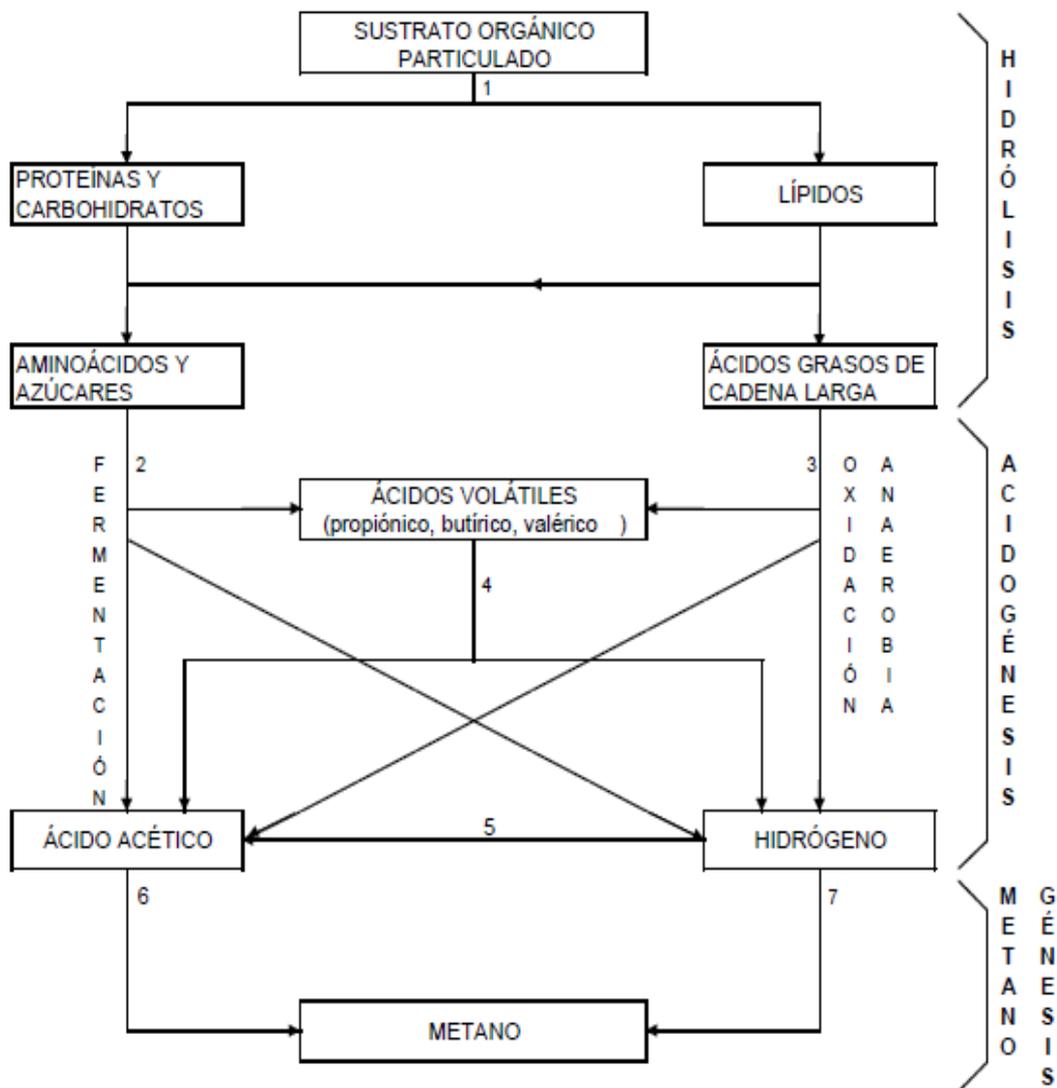


Ilustración 1 Transformación que tienen lugar en el proceso de digestión anaerobia. Adaptada de (Grady, Daigger, & Lim, 1999).

En la hidrólisis suceden condiciones similares a las aerobias, la materia orgánica suspendida debe ser solubilizada antes de poder ser consumida por las bacterias. Además, las moléculas orgánicas solubles de gran tamaño y peso molecular deben ser transformadas en otras más simples para facilitar su transporte a través de la membrana celular. Estas transformaciones son reacciones hidrolíticas catalizadas por enzimas extracelulares sintetizados por las bacterias y se han agrupado bajo el nombre de reacciones de hidrólisis (reacción 1).

La etapa de acidogénesis comprende los procesos de fermentación, a través de los cuales se degrada los aminoácidos y azúcares (reacción 2), los procesos de oxidación anaerobia, a través de los cuales se degradan los ácidos grasos de cadena larga y los ácidos volátiles (reacción 3 y 4), así como el proceso de formación de ácido acético a partir de hidrógeno y dióxido de carbono (reacción 5).

Los principales productos de las reacciones de fermentación de azúcares y aminoácidos son ácidos grasos de cadena corta (propiónico, butírico) y los precursores directos de metano, como son hidrógeno y acético. La producción de hidrógeno en estas reacciones es pequeña y se produce mediante reacciones de deshidrogenación.

La mayor parte del hidrógeno se produce en las reacciones de oxidación de los ácidos grasos volátiles y de cadena larga por reducción de los iones que actúan como aceptores de electrones. Por este motivo, esta reacción recibe el nombre de oxidación anaerobia. La producción de hidrógeno mediante dicha reacción es muy importante para el correcto funcionamiento del proceso global por dos motivos, es uno de los precursores a partir de los cuales se forma metano y la producción de hidrógeno permite que el acético (otro precursor del metano) sea el producto mayoritario de la etapa de acidogénesis. Debido a su termodinámica, las reacciones de oxidación anaerobia de ácidos grasos están inhibidas por altas presiones de hidrógeno (Grady, Daigger, & Lim, 1999).

La producción de ácido acético a partir de la reducción de dióxido de carbono en hidrógeno como dador de electrones recibe el nombre de homo acetogénesis, siendo la principal característica de las bacterias que la llevan a cabo su habilidad para reducir el dióxido de carbono con hidrógeno molecular, obteniendo acético como producto final (Schink & Friedrich, 1994).

La importancia de esta reacción en el proceso global es mínima porque en las condiciones mesofílicas ( $T=35^{\circ}\text{C}$ ) habituales en un digestor anaerobio, las bacterias homoacetogénicas necesitan para su desarrollo una concentración de hidrógeno bastante superior a las bacterias sulfato-reductoras y metanogénicas. En consecuencia, se consideran especies no dominantes en un digestor anaerobio y no son tenidas en cuenta en la mayoría de los modelos propuestos para representar el proceso de digestión anaerobia (Zhang & Noike, 1994).

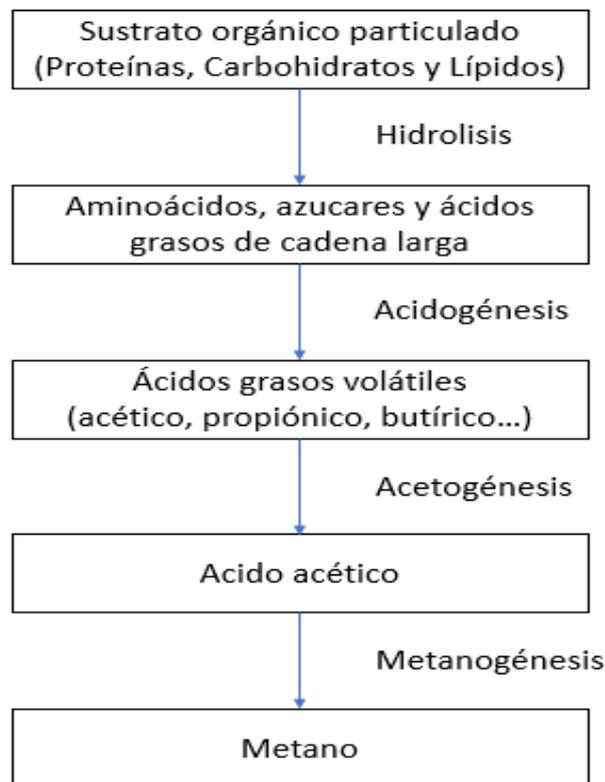
En las reacciones incluidas en la etapa de acidogénesis los compuestos orgánicos actúan tanto de dadores como aceptores de electrones, siendo el resultado de las reacciones una mezcla de compuestos oxidados y reducidos. En consecuencia, la DQO del sistema en su conjunto no cambia significativamente porque continúan en otros compuestos orgánicos. Únicamente la desabsorción del hidrógeno formado disminuye la DQO del sistema.

La etapa de metanogénesis comprende la formación de metano a partir de acético y a partir de hidrógeno. Habitualmente dos terceras partes del metano producido en el proceso de digestión anaerobia proceden del ácido acético y el resto del hidrógeno.

El papel del hidrógeno es clave para el correcto funcionamiento del proceso. Las reacciones de oxidación anaerobia de los ácidos grasos volátiles y de cadena larga son desfavorables en condiciones estándar con variaciones de energía libre positivas. Sin embargo, bajo condiciones en las que la presión parcial de hidrógeno es  $10^{-4}$  atm o inferior, las reacciones son favorables termodinámicamente y pueden tener lugar. Este hecho implica que las bacterias que producen hidrógeno a través de las reacciones de oxidación anaerobia están obligatoriamente ligadas a las bacterias metanogénicas que lo consumen. Únicamente cuando las bacterias metanogénicas mantienen la concentración de hidrógeno suficiente baja, las bacterias que lo producen pueden crecer.

Asimismo, el crecimiento de las bacterias metanogénicas que consumen hidrógeno esta obligatoriamente ligado al crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno porque son éstas las que les proporciona el sustrato necesario para su crecimiento (Grady, Daigger, & Lim, 1999).

En el siguiente esquema se muestra el proceso simplificado más utilizado en la bibliografía para representar los procesos que tienen lugar en la digestión anaerobia.



Esquema 1 Simplificación de las transformaciones que tienen lugar durante el proceso de digestión anaerobia

Como puede verse en el esquema, se distinguen únicamente cuatro reacciones: hidrólisis (transformación del sustrato orgánico particulado en soluble), acidogénesis (formación de ácidos volátiles por fermentación de la materia orgánica), acetogénesis (transformación de los ácidos grasos en ácido acético) y metanogénesis (transformación del ácido acético en metano).

## 1.2. Reactores anaerobios

En los últimos 40 años, la tecnología del reactor anaerobio evolucionó desde ensayos localizados a escala de laboratorio, hasta implementaciones exitosas a nivel mundial en una variedad de industrias. Los reactores de lecho granular de alta velocidad se caracterizan por su pequeño requerimiento de espacio con altas tasas de carga volumétrica aplicables. Los mejores resultados se obtienen cuando el lecho granular consta de gránulos altamente activos y bien sedimentables. La granulación proporciona una rica diversidad microbiana, alta concentración de biomasa, alto tiempo de retención de sólidos, buenas características de sedimentación, reducción en los costes de operación del volumen del reactor, y alta tolerancia a inhibidores y cambios de temperatura (Lier, Zee, Frijters, & Ersahin, 2015).

Como proceso de generación de energía, la tecnología de tratamiento anaeróbico ha estado recibiendo un interés creciente desde su primera aplicación, principalmente debido a la sencillez de la tecnología, bajo requerimiento de espacio, bajo exceso de producción de lodos y balance energético positivo en comparación con las tecnologías convencionales de tratamiento aerobio (Lier, Mahmoud, & Zeeman, 2008).

El principal problema de estos sistemas es la necesidad de tratamiento del efluente resultante, pues contiene grandes cantidades de materia orgánica, nutrientes y patógenos que constituían un gran problema en el cauce receptor. Por ello el post tratamiento mediante un tratamiento aerobio se consideraba inevitable en este tipo de plantas (Lier, Mahmoud, & Zeeman, 2008).

El desarrollo de los procesos anaerobios se dio a partir de 1950 cuando recibieron un gran impulso, lo cual aumentó los conocimientos de ellos y cambió sus fundamentos de diseño, que dieron lugar a nuevos sistemas: filtro anaerobio de flujo ascendente (1960), manto de lodo de flujo ascendente o conocidos también como RAFA en español o UASB en inglés, (1978) como se muestra en la ilustración 2 (Nicolella, 2000), reactor de biopelícula inmovilizada (1985), reactor anaerobio de lecho fluidizado conocido como RALF o EGSB en inglés (1985) como se muestra en la ilustración 3 (Van Der Berg, 1986).

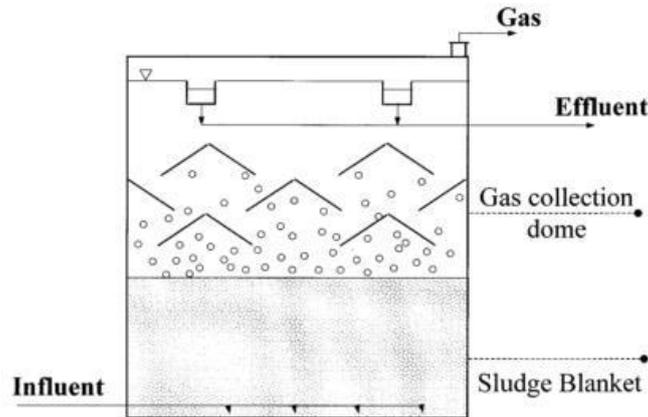


Ilustración 2 Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (RAFA) (Nicoletta, 2000)

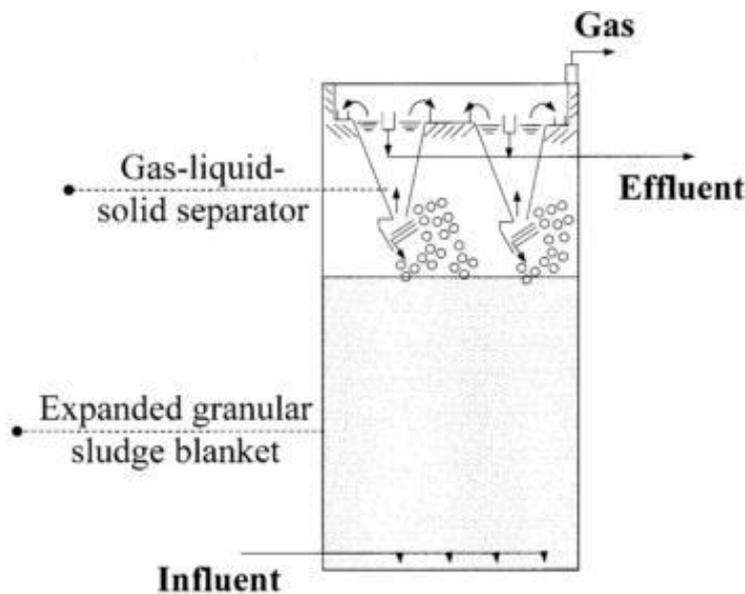


Ilustración 3 Reactor Anaerobio de Lecho Fluidizado (RALF) (Van Der Berg, 1986)

Como resultado del mayor conocimiento, los sistemas anaeróbicos de tratamiento de aguas residuales, especialmente los reactores anaerobios de flujo ascendente (RAFA), han ocupado una posición sobresaliente especialmente en varios países tropicales por sus condiciones de temperatura favorables.

Sin embargo, esta gran aceptación ha llevado frecuentemente al desarrollo de proyectos y la implementación de plantas de tratamiento con serios problemas conceptuales. En principio, todos los compuestos orgánicos pueden degradarse mediante un proceso anaeróbico, que es más eficiente y económico cuando los residuos son fácilmente biodegradables (Lemos, 2007).

Los digestores anaeróbicos se han utilizado ampliamente en el tratamiento de residuos sólidos, incluidos los desechos agrícolas, excrementos de animales, lodos de plantas de tratamiento de

aguas residuales y residuos urbanos, y se estima que se han construido millones de digestores anaeróbicos en todo el mundo con este propósito. La digestión anaeróbica también se ha utilizado ampliamente en el tratamiento de efluentes de las industrias agrícolas, de alimentos y bebidas, tanto en países desarrollados como en desarrollo.

La aplicación de tecnología anaeróbica depende mucho de la temperatura de las aguas residuales, debido a la baja actividad de los microorganismos anaeróbicos a temperaturas inferiores a 20°C, y a la inviabilidad de los reactores. Esto se debe a que las aguas residuales domésticas están más diluidas que los efluentes industriales, lo que resulta en bajas tasas de producción volumétrica de gas metano, lo que hace que su uso como fuente de energía térmica no sea económica. Por lo tanto, el tratamiento anaeróbico de las aguas residuales domésticas se vuelve mucho más atractivo para los países de clima tropical y subtropical, que son principalmente países en desarrollo (Lemos, 2007).

Uno de los problemas que planteaba el RAFA era la falta de contacto entre el influente y el lecho granular que producía la disminución de la eficacia de depuración. Otro de los problemas es el tratamiento de aguas a menores temperaturas ya que no conseguía buenas eficacias de eliminación con temperaturas entre los 4 y 20°C debido a una reducción del volumen activo del reactor (Seghezzo, Zeeman, Liel, Hamelers, & y Lettinga, 1998).

Para paliar estos dos problemas, era necesaria una mejor distribución y mezcla del influente, por lo que en este nuevo reactor RALF se fluidiza el lecho para aumentar el contacto entre el agua residual y el fango. La fluidización del lecho se consigue de dos formas: aumentando la recirculación del efluente y con una mayor producción de biogás mediante la introducción de más carga (Grady, Daigger, Love, & Filipe, 2011) (Lim, 2014) (Seghezzo et al., 1998).

Los RALF son una extensión del RAFA y, al igual que en ellos, la mezcla se produce por el biogás producido y la introducción del líquido influente, pero, los RALF incorporan mayor velocidad superficial (Nicoletta, 2000).

Para conseguir una mayor velocidad superficial que permita la expansión del lecho, los reactores son más profundos y estrechos de forma que la producción de biogás y la recirculación tienen mayor efecto pues se disminuye el área transversal (Grady, Daigger, Love, & Filipe, 2011).

La velocidad superficial a la que se opera un RALF es siempre mayor de 4 m/h de forma que el lecho se expande y se produce una mezcla completa sin zonas muertas en el reactor (Seghezzo et al., 1998).

A pesar de que la recirculación aplicada en el reactor RALF representa una gran ventaja a la hora de eliminar altas cargas o compuestos tóxicos, ésta puede no ser aplicada. De hecho, se ha demostrado que en aguas residuales domésticas la recirculación no es necesaria. Otra de las grandes ventajas de este tipo de reactores es su alta capacidad de eliminación de bajas cargas al contrario de la baja capacidad que mostraban los RAFA. La concentración de DQO que son capaces de depurar estos reactores puede ser menor de 1000 mg/L a baja o media temperatura. En los casos en los que la carga orgánica del influente sea baja, puede no aplicarse recirculación. (Seghezzo et al., 1998).

Aunque anteriormente se ha señalado que la velocidad superficial es siempre mayor de 4 m/h, de normal estos reactores se operan a unas velocidades comprendidas entre 10-15 m/h. Como se observa en la Ilustración 3, los RALF son más altos que anchos para asegurar una elevada velocidad superficial por lo que la relación entre altura y diámetro suele estar en el rango entre 4 y 5 (Lim, 2014) (Nicolella, 2000).

En cuanto a sus inconvenientes hay que señalar que posee los mismos que un RAFA, aunque, al contrario que éste, pueden ser cargados con cargas altas si el agua influente contiene muchos sólidos suspendidos. Por el contrario, el RALF es completamente dependiente de un fango granular, por lo que un reactor sin un fango bien granulado no resulta efectivo, ya que la elevada velocidad superficial produce el lavado de todas las partículas que no sean gránulos densos (flóculos o sólidos suspendidos) (Grady, Daigger, Love, & Filipe, 2011).

En lo referente al lavado de las partículas cabe señalar que los sólidos de un influente no podrán ser degradados biológicamente por un reactor de este tipo, pues la elevada velocidad superficial operacional produce el lavado de estas partículas (Lim, 2014) & (Seghezzo et al., 1998).

### 1.3. Procesos de granulación en reactores anaerobios

Para la operación eficiente de los biorreactores granulares es útil una mejor comprensión de las características de los gránulos. Recientemente, se han realizado desarrollos en la caracterización de los gránulos microbianos con enfoques innovadores y tecnologías sofisticadas. La adición de aditivos externos tales como polímeros sintéticos y naturales puede mejorar las características del fango granular. La bio aumentación podría ser una herramienta útil para mejorar la estabilidad y reducir significativamente la duración de los períodos de puesta en marcha. La aplicación de sustratos fácilmente degradables tales como glucosa, sacarosa, y ácidos grasos volátiles son altamente beneficiosas en el tratamiento de aguas residuales tóxicas y en la mejora de las características de los lodos. El conocimiento emergente sobre tales características podría permitir favorecer la optimización de la granulación microbiana como una de las técnicas más confiables en el tratamiento anaeróbico (Subramanyam, 2013).

Los gránulos están constituidos por materia orgánica inerte o inorgánica y colonias de bacterias de forma que contienen millones de microorganismos por gramo de biomasa. Tras el periodo de granulación, los gránulos resultantes son muy densos y poseen una alta capacidad de sedimentación de forma que se evita su lavado del reactor (Chong, Sen, Kayaalp, & Ang, 2012).

Esta elevada sedimentabilidad hace posible la retención de la biomasa en el reactor permitiendo trabajar con tiempos de retención de sólidos muy elevados. Además, la granulación se convierte en un entorno favorable para los microorganismos pues permite la interacción entre los diferentes grupos bacterianos y, como consecuencia, la formación de colonias capaces de degradar aguas residuales complejas (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004) (Yan & Tay, 1997).

### 1.3.1. Factores que afectan al proceso de granulación

La importancia de la granulación en los estudios sobre la micro morfología de los gránulos, demostraron que las colonias de bacterias acetogénicas están estrechamente vinculadas con las micro colonias de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas que permiten una eficiente transferencia de hidrógeno entre especies, y como resultado, altas tasas de degradación (Hulshoff Pol, de Castro Lopes, Lettinga, & Lens, 2004).

Primero las velocidades de sedimentación del fango son de aproximadamente 60 m/h, mientras que las superficiales en los reactores RAFA se mantienen por debajo de 2 m/h. Esto permite un desacoplamiento del tiempo de retención del hidráulico frente al tiempo de retención de sólidos. Se puede conseguir tiempo de retención de sólidos de más de 200 días en tiempos de retención hidráulicos de solo 6 horas. Segundo se pudo demostrar que las altas tasas de carga volumétrica de más de 50 kg de Demanda Química de Oxígeno (DQO)/m<sup>3</sup>-día podrían acomodarse bien en condiciones mesofílicas, con actividades metanogénicas específicas de más de 2 kg de DQO/kg VSS día.

El proceso de granulación que suele ser un proceso largo (entre 2-8 meses en reactores anaerobios) cosa que dificulta la puesta en marcha de los reactores anaerobios de lecho granular. De hecho, se cree que este proceso ha evitado la extensión de este tratamiento a aguas residuales industriales por lo que el estudio de este proceso y su mejora ha centrado la atención de numerosos grupos de investigación. En estos estudios se ha observado que la granulación se ve afectada por numerosos factores físicos, químicos y biológicos (Chong, Sen, Kayaalp, & Ang, 2012) entre los que se han descrito y estudiado en profundidad los siguientes:

La presencia de núcleos: al igual que la presencia de núcleos favorece la formación de gotas de lluvia, los núcleos son el ingrediente inicial de la granulación a los que se adhieren los microorganismos. Una vez se adhieren las bacterias, el crecimiento de estas producirá la granulación del fango. De hecho, se han realizado diferentes estudios donde se ha promovido la granulación mediante la introducción de partículas inertes en el fango, ya que éstas han actuado como núcleos a los que se han adherido las bacterias. De hecho, hay estudios en los que en fangos en los que se habían eliminado todas las partículas inertes no fue posible la formación de gránulos (Hulshoff Pol, De Castro Lopes, Lettinga, & Lens, 2004).

Con la intención de promover la granulación, tradicionalmente se han introducido polímeros tanto naturales como sintéticos que, muestran buenos resultados y disminuyen el tiempo de formación del lecho granular (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Por otro lado, se ha observado que la introducción o presencia de cationes divalentes y trivalentes es capaz de contrarrestar las cargas negativas en la superficie de las células permitiendo la formación de núcleos a partir de los que se desarrollan los gránulos. Los cationes que se han empleado para ello son Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>. El más empleado actualmente es el Ca<sup>2+</sup> con el que concentraciones en torno a 100-200 mg/L en aguas residuales ya han producido

efectos positivos. Sin embargo, a altas concentraciones (500-600 mg/L), el calcio tiene efectos negativos sobre la granulación destruyendo los gránulos previamente formados. Por ello, se cree necesaria la realización de un análisis previo que defina la dosis óptima a proporcionar según el tipo de biomasa a la que se aplique (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Velocidad superficial y tiempo de retención hidráulico: entre los diferentes estudios realizados sobre granulación, la comunidad científica ha llegado al acuerdo de que una alta velocidad superficial unida a un corto tiempo de retención hidráulico favorece el proceso de granulación. Este hecho se explica con la teoría de la presión selectiva (selection pressure theory) según la cual diferentes factores (ambientales, condiciones de proceso y operación, tipo de reactor y fango inóculo) se combinan produciendo una cierta presión en las partículas del reactor, de forma que se favorece el crecimiento microbiano de las bacterias dispersas o agregadas: un TRH alto y baja velocidad superficial permite el crecimiento de las bacterias en dispersión mientras que, un bajo TRH y alta velocidad superficial producen el lavado de las bacterias dispersas y favorece el crecimiento de las bacterias retenidas en los gránulos. A pesar de ello, siempre se aplicarán TRH con un valor igual o superior a un valor crítico estipulado como TRH mínimo (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004) (Liu, Xu, Lou, Yang, & Tay, 2003).

Carga orgánica introducida: en diferentes estudios se ha observado que cuanto mayor carga se introduce en el reactor, mayor crecimiento microbiano se produce, pero sólo se logra si se aumenta gradualmente la carga orgánica. Si se introduce una alta carga orgánica, se produce un elevado caudal de biogás que aumenta la velocidad superficial del reactor y desencadena el lavado del fango inóculo del reactor (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Características del sustrato: éstas influyen en la formación, composición y estructura de los gránulos que se desarrollan en los reactores anaerobios. Se ha observado que un incremento en la complejidad de la composición del sustrato propicia el desarrollo de una mayor diversidad de subpoblaciones metanogénicas. También se ha observado que, si se emplean carbohidratos con elevada energía libre de Gibbs durante la puesta en marcha del reactor, se consigue una elevada producción de polímeros extracelulares por parte de las bacterias acidogénicas, que favorecen el desarrollo de gránulos por la agregación de bacterias y material en dispersión promovida por éstos (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Características del fango inóculo: para evitar el lavado del fango inóculo siempre se prefieren fangos de elevada sedimentabilidad. Si es posible, se inoculan los reactores con biomasa anaerobia granular para evitar los largos periodos de puesta en marcha, aunque, este tipo de fangos siempre están disponibles. También se ha observado que una biomasa activa favorece el lavado del fango por lo que siempre será preferible un fango inactivo (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

pH: el pH es un factor crucial en el proceso anaerobio por lo que su monitorización es esencial. Además, éste también influye en el mantenimiento de los gránulos de forma que, un pH en el rango ácido entre 3 a 5 o básico de 8,5 a 11 desembocan en la pérdida de la granulación. Por el contrario, un pH entre 5,5 y 8 permite el mantenimiento de la estructura granular (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Temperatura: Este factor afecta en gran medida a las bacterias metanogénicas que tienen una velocidad de regeneración muy baja si la temperatura es inferior a los 30°C. Por ello siempre suelen emplearse temperaturas dentro del rango mesofílico, entre 22 a 40°C. En condiciones termofílicas se ha observado que la calidad del efluente empeora por el lavado del fango y no resulta rentable el consumo de energía necesario para mantener ese rango de temperaturas (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Por lo general, los fangos granulares presentan ciertas características específicas que les hacen capaces de degradar elevadas cargas orgánicas. Entre estas características se encuentran las siguientes:

Microestructura: los gránulos han sido objeto de estudio a nivel microscópico con la intención de descifrar el mecanismo de la granulación. En estas observaciones se ha descubierto una estructura multicapa en los gránulos: en primer lugar, existe una capa exterior donde las bacterias acidogénicas son las dominantes, en la capa media persisten las bacterias productoras y consumidoras de hidrógeno e interiormente, su núcleo está dominado por bacterias metanogénicas del género *Methanotrix*. Sin embargo, también se han encontrado gránulos sin una estructura en capas donde las bacterias filamentosas son predominantes en todo el gránulo. Se han discutido diferentes hipótesis sobre las causas de la formación de una estructura uniforme o por capas llegándose a la conclusión de que, el desarrollo de una estructura u otra depende de la composición del sustrato: si el sustrato está formado por carbohidratos, se desarrolla una estructura por capas, pero, si el reactor se alimenta principalmente por proteínas, el gránulo se desarrolla uniformemente. A pesar de ello no se ha demostrado que esta hipótesis pueda generalizarse a todos los fangos granulares (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Actividad metanogénica: este parámetro se plantea como indicador de la actividad metabólica de la biomasa ya que las bacterias metanogénicas de los gránulos juegan un papel fundamental en la degradación anaerobia. Este parámetro representa la cantidad de metano producido por unidad de biomasa y tiempo, por lo que se emplea para evaluar el funcionamiento del reactor anaerobio. Un fango granular es capaz de eliminar mayor carga orgánica por lo que tendrá mayor actividad metabólica y, por tanto, mayor actividad metanogénica que otro fango no granulado. El valor de la actividad metanogénica siempre se emplea para realizar comparativas entre diferentes aguas residuales y biomásas (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Propiedades superficiales: en los diferentes estudios sobre la granulación, se ha observado que la hidrofobia superficial de los gránulos es un aspecto a tener en cuenta, ya que juega un papel crucial en la granulación tanto aerobia como anaerobia. Cuando los microorganismos de la capa exterior del gránulo poseen superficies hidrófobas es más fácil su retención en el reactor y, por tanto, su crecimiento. Se ha observado que ciertas variaciones en las condiciones ambientales como pueden ser los niveles de oxígeno cambian la hidrofobia de la superficie del gránulo. También se ha observado que cuanto más cargada negativamente está la superficie de los gránulos, más débiles son y más fáciles son de romper (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Color aparente: por lo general, los gránulos anaerobios son de color marrón oscuro o negros, pero cuando se cambia a bajas cargas o baja velocidad superficial, su color cambia a colores grises o blanco, se vuelven menos densos y más débiles, ya que su interior se ahueca. Estos cambios de color son un indicador de los cambios que se producen en el interior del reactor: cuando hay buena difusión de los nutrientes en el reactor, éstos difunden hacia el interior del gránulo y éste se oscurece (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Densidad y tamaño: En un reactor de lecho granular los gránulos deben ser densos para evitar su lavado del reactor y favorecer el funcionamiento del reactor anaerobio. En cuanto al tamaño de estos, debe existir un equilibrio dimensional pues los gránulos pequeños serán lavados, pero en los grandes será difícil el acceso de los nutrientes hasta el centro de los mismos. Cuando no haya buena difusión de los nutrientes hacia el interior, éste se tornará hueco, perderá densidad y podrá ser lavado del reactor por flotación. Por ello, dentro de los reactores existe una regulación propia del tamaño de los gránulos dependiente de numerosos factores (por ejemplo, las condiciones hidrodinámicas o la carga orgánica). Por lo general el tamaño de los gránulos medianos suele rondar entre 1 y 2 mm siendo el rango de distribución del tamaño de los gránulos muy estrecho (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004). Se considerará partículas mayores a 300  $\mu\text{m}$ .

Resistencia mecánica: Actualmente se han propuesto diferentes métodos para la medida de esta característica, pero aún no existe un método estándar para ello. Durante los diferentes estudios se ha observado que la robustez de los gránulos depende de muchos factores como la producción de polímeros extracelulares o la carga orgánica y que es siempre preferible un alto grado de solidez para la operación de los lechos granulares anaerobios (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004).

Según señalan algunos autores, el proceso de granulación tiene tres fases (Yan & Tay, 1997) (Li & Yu, 2011): una primera de aclimatación donde se inicia la granulación de forma lenta; la segunda llamada propiamente granulación en la que los gránulos formados en la anterior fase crecen rápidamente y; la fase de maduración en la que los gránulos crecen y se estabilizan. Aunque éstas parecen ser las fases en las que se desarrolla el proceso, no existe consenso sobre un modelo que logre describirlo por completo y además permita la predicción.

Desde el descubrimiento del primer fango granular se han propuesto múltiples mecanismos y modelos que permitieran entender este proceso y acortar el tiempo para su desarrollo sin llegar a una solución única y consensuada. En la bibliografía, se describen diferentes mecanismos basados en aspectos fisicoquímicos, biológicos o estructurales. Los trabajos más recientes clasifican estos modelos en físicos, fisicoquímicos, microbianos y termodinámicos.

Las teorías físicas se basan principalmente en los factores físicos que producen la granulación como factores determinantes de la granulación, la presencia de núcleos y la velocidad superficial. Entre este grupo de teorías se encuentra uno de los mecanismos descritos más antiguos y estudiados: el modelo de núcleos inertes. Esta teoría está relacionada con la presencia de núcleos inertes o sólidos suspendidos a los que se adhieren los microorganismos para formar núcleos embrionarios a partir de los cuales se desarrollaran grandes gránulos (Hulshoff Pol, De Castro Lopes, Lettinga, & Lens, 2004). Otro modelo basado en factores físicos es el modelo de la presión selectiva que se basa en la influencia que realiza la velocidad superficial y el TRH en el proceso de granulación (Hulshoff Pol, De Castro Lopes, Lettinga, & Lens, 2004).

Según Liu et al. (2003) estos mecanismos también se encuadran dentro de la categoría de modelos fisicoquímicos, junto con otros modelos basados principalmente, en las reacciones químicas que se producen entre los diferentes componentes de las membranas celulares y otros compuestos del reactor. Dentro de este grupo se encuadra el modelo de deshidratación local e interacción hidrofóbica, según el cual la deshidratación de la superficie de las bacterias y su mayor hidrofobicidad permiten su agregación. Según esta teoría la hidrofobia de las células bacterianas se mide por medio del ángulo de contacto con el agua de forma que la superficie será: hidrofílica con ángulos menores a 45°, medio hidrófoba con ángulos entre 50 y 60° e hidrófoba con un ángulo de contacto mayor de 90°. Por otro lado, se ha descrito otro mecanismo de la granulación según la formación de enlaces iónicos entre las bacterias cargadas negativamente y cationes multivalentes y, se conoce como el modelo de enlace iónico con multivalencias positivas (multi-valence positive ion-bonding model) (Liu et al., 2003).

### 1.3.2. Influencia de la adición de Chitosán en el proceso de granulación

En los últimos años, el uso de Chitosán y sus derivados como floculantes en el tratamiento del agua ha recibido considerable atención debido a sus muchas ventajas, incluyendo su amplia disponibilidad, respeto al medio ambiente, biodegradabilidad y buenas características estructurales.

La influencia de los elementos estructurales de los floculantes basados en Chitosán sobre sus propiedades de floculación se enfatiza en esta revisión al examinar diferentes mecanismos de floculación y sus aplicaciones en el tratamiento de varias aguas residuales que contienen diferentes contaminantes (coloides suspendidos insolubles, pero también materias disueltas).

El rápido desarrollo de las industrias modernas en todo el mundo ha estado acompañado por la producción de aguas residuales que contienen diferentes tipos de contaminantes disueltos y no disueltos y, por lo tanto, de contaminación del agua cada vez más severa. Para abordar este problema, se han desarrollado y utilizado en el tratamiento del agua una amplia gama de tecnologías, como la coagulación/floculación, adsorción, oxidación/reducción, filtración por membrana y biotecnología.

Entre estas técnicas, la coagulación/floculación es una de las más utilizadas para lograr la separación sólido-líquido, dada su rentabilidad y facilidad de operación. En los procesos de coagulación/floculación, los pequeños coloides suspendidos en las aguas residuales se desestabilizan mediante la adición de coagulantes. La coagulación es seguida por la floculación, en la cual las partículas desestabilizadas se agregan para formar flóculos más grandes que pueden eliminarse de manera efectiva por sedimentación.

El Chitosán es un copolímero lineal de D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) sintetizado por la desacetilación alcalina de la quitina, el segundo polímero natural más abundante en el mundo, después de la celulosa. Los parámetros estructurales que determinan las propiedades del Chitosán, incluyendo su solubilidad en agua, conformación y rigidez de la cadena en solución, son su peso molecular y el grado de desacetilación. Cuando el grado de desacetilación alcanza aproximadamente el 50%, la quitina generalmente se vuelve soluble en un medio ácido acuoso y se llama Chitosán (Muzzarelli y Muzzarelli, 2005). Las estructuras tanto del Chitosán completamente desacetilado como de su quitina precursora se muestran en la Ilustración 4.

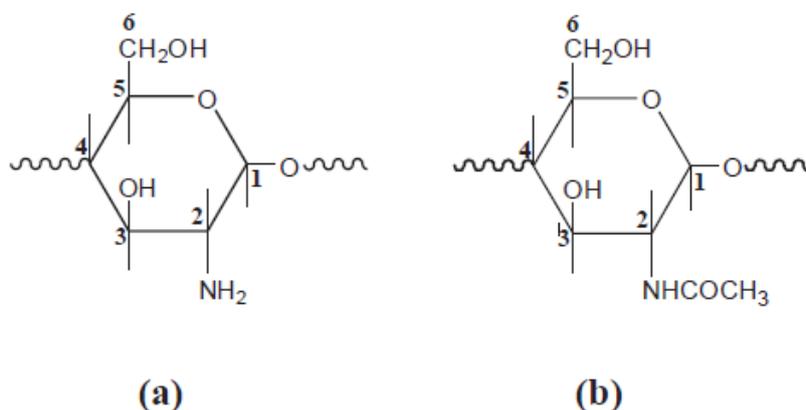


Ilustración 4 Las estructuras químicas del Chitosán (a) y su quitina precursora (b).

El Chitosán y sus derivados son conocidos como floculantes eficaces, seguros y rentables con aplicaciones en una amplia variedad de entornos, incluido el tratamiento de efluentes industriales y agua potable. Sin embargo, maximizar las aplicaciones de los floculantes basados

en Chitosán requiere investigaciones a fondo y de nivel molecular de sus mecanismos de acción con respecto a sus características estructurales.

La mayoría de las investigaciones sobre los mecanismos subyacentes a la floculación basada en Chitosán y su relación con las características estructurales de los respectivos floculantes ha sido más cualitativa que cuantitativa (Laue y Hunkeler, 2006). El desafío para tales estudios es la dificultad para analizar las características estructurales de los floculantes, incluidas sus estructuras de corto y largo alcance, y las complejas interacciones con la superficie de los contaminantes específicos. Las fuerzas involucradas en estas interacciones incluyen enlaces covalentes, interacción electrostática, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y otras fuerzas altamente específicas que resultan en mecanismos de floculación inusuales (Ran Yang, 2016).

Debido a que el Chitosán y sus derivados son polielectrolitos típicos, su estructura de largo alcance en solución es crítica para el rendimiento final de la floculación. Además, la dosis óptima de floculantes a base de Chitosán está generalmente en el rango de 0,1 a 100 mg / L, que según la teoría de la solución del polímero es extremadamente diluida.

El Chitosán y sus derivados tienen muchas ventajas notables que justifican estudios adicionales que conducen a su aplicación de amplio alcance. En el campo del tratamiento del agua, se deben resolver varios problemas importantes relacionados con el coste y la seguridad de los floculantes antes de que puedan ser ampliamente utilizados en aplicaciones prácticas. Más importante aún, las relaciones óptimas de actividad de estructura de los floculantes basados en Chitosán deben ser bien conocidas, ya que el rendimiento final de la floculación de los floculantes basados en Chitosán depende en gran medida de sus factores estructurales (Ran Yang, 2016).

Por ello, se ha hecho necesario estudiar la granulación que se produce en el tratamiento de las aguas residuales industriales contaminadas con disolventes para evaluar la estabilidad del granulado y la robustez de la operación. Los investigadores ya han estudiado la formación de gránulos en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con fenol (Ramakrishnan, 2006), del procesamiento de caucho natural (Thanh, 2016), o de la industria de la pulpa de kraft (Lu, 2017).

La adición de polímeros catiónicos a los reactores anaeróbicos de alta tasa mejora el proceso de granulación, lo que acelera el desarrollo de los gránulos (Show, 2004). Entre estos polímeros catiónicos, el Chitosán se destaca por su disponibilidad, su compatibilidad con el medio ambiente y su biodegradabilidad (Yang, Li, Huang, Yang, & Li, 2016). Aunque el Chitosán no ha sido probado por su efecto de granulación en aguas residuales que contienen disolventes, algunos estudios han señalado el efecto benéfico de este biopolímero cuando se usa con otros sustratos. (El-Mamouni, Leduc, & Guiot, 1998) informaron de que la tasa de granulación en los reactores UASB alimentados con sacarosa era 2,5 veces mayor en el reactor que contenía Chitosán que en el reactor de control. (Hudayah, Suraraksa, & Chaiprasert, 2016) encontraron que en el tratamiento de aguas residuales que contienen glucosa y ácidos grasos volátiles (AGV) como sustratos, la adición de Chitosán aumentó el tamaño medio del diámetro de los gránulos en 11,5mm. La granulación anaeróbica es un proceso complejo en el que intervienen no sólo

factores físicos sino también biológicos y microbiológicos (Hulshoff Pol, de Castro Lopes, Lettinga, & Lens, 2004).

### 1.3.3. Procesos de granulación de la biomasa en reactores RAFA

Los procesos de granulación en reactores anaerobios se pueden considerar como la razón principal de la introducción exitosa del concepto de reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA) para el tratamiento anaeróbico de los efluentes industriales. Este proceso de granulación permite tasas de carga en reactores RAFA mucho más allá de las tasas de carga comunes aplicadas en los procesos convencionales de fangos activados. La reducción resultante en el tamaño del reactor del área requerida para el tratamiento conduce a costes de inversión bajos, además de la reducción de costes de operación debido a la ausencia de aireación (Hulshoff Pol, de Castro Lopes, Lettinga, & Lens, 2004).

Los fangos granulares formados en reactores anaerobios de flujo ascendente juegan un papel importante en el campo del tratamiento anaeróbico debido a sus ventajas de ingeniería sobre las formas floculantes convencionales, como son la rica diversidad microbiana, alto tiempo de retención de sólidos debido a sus características de sedimentación superiores, maximizando la proporción de microorganismos en el espacio, y mayor capacidad para soportar carga de choque o cambios de temperatura.

Los gránulos del fango se desarrollan mediante autogranulación de microorganismos y equilibrio dinámico entre el crecimiento y la descomposición de los gránulos dando como resultado la coexistencia de fangos con diferentes tamaños en el reactor (Ahn, Song, Lee, & and Park, 2002). Según el número de Reynolds y la velocidad de sedimentación, el diámetro de las partículas de 0,30 mm debe considerarse como un buen granulado (Bhunja & Ghangrekar, 2006) desde el aspecto de ingeniería de la operación del reactor.

Por lo que respecta a su funcionamiento y diseño, la relación entre la altura y la profundidad suele estar entre 0,2 y 0,5 y la velocidad de flujo ascendente se encuentra en el intervalo de 0,5 a 1 m/h. el tiempo de retención hidráulico (TRH) suele estar entre 0,2 y 2 días (Grady, Daigger, Love, & Filipe, 2011) (Lim, 2014).

Las cargas orgánicas que soportan estos reactores están entre los valores de 10 a 15 kg DQO/m<sup>3</sup>·día por lo que son reactores diseñados para el tratamiento de altas cargas orgánicas (Lim, 2014). La degradación de esta alta carga produce biogás que también aumenta el flujo ascendente, por lo que se operan sin recirculación o muy baja para lograr velocidades superficiales dentro del intervalo establecido (Lim, 2014).

Este biogás producido es el que se encarga de mezclar el fango con el influente (Nicoletta, 2000) aunque la distribución del influente de forma uniforme también contribuye a la mezcla completa dentro del reactor. A pesar de ello puede existir un espacio muerto dentro del reactor en el que no se produce actividad microbiológica. Este espacio también es dependiente de la temperatura,

aunque algunos autores la sitúan siempre en torno al 10 o 11% del volumen del reactor. En el caso de que la temperatura sea baja, la zona muerta será mayor y, por tanto, el volumen de mezcla menor ya que se producirá menor cantidad de biogás (Lim, 2014).

En general, en el reactor RAFA, el lecho granular tarda en formarse entre 2 y 8 meses, periodo en el cual la eficacia de eliminación va en aumento hasta conseguir elevadas eficacias de eliminación de carga orgánica. (Chong, Sen, Kayaalp, & Ang, 2012). Finalmente, los gránulos que se pueden observar en el reactor presentan un diámetro mayor de 300  $\mu\text{m}$  y una velocidad de sedimentación cercana a 60 m/h (Hulshoff Pol, De Castro Lopes, Lettinga, & Lens, 2004).

Cuando se inocula, se introduce gránulos en una cantidad que oscila entre los 10 y 30% del volumen del reactor. Lógicamente cuando mayor volumen de gránulos se introduzca, mayor carga orgánica podrá soportar el reactor y se precisará menores tiempo de arranque (Lim, 2014).

#### 1.3.4. Procesos de granulación de la biomasa en reactores RALF

Los RALF son uno de los reactores anaeróbicos de alta velocidad puede ser uno de los más vendidos basados en la tecnología de lodos granulares para el tratamiento de aguas residuales. El éxito de esta configuración se debe al mayor contacto entre la biomasa y las aguas residuales, lo que permite el tratamiento de compuestos poco biodegradables y mayores tasas de carga en comparación con las aguas residuales tratadas con un reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA). Uno de los posibles inconvenientes de un reactor RALF es que su uso dificulta la consecución de un compromiso entre las posibles pérdidas de biomasa y la expansión del lecho. Por ejemplo, (Kalyuzhnyi S. V, y otros, 1996) encontraron que el aumento de la carga orgánica a 44,9 g DQO/L\*d al disminuir el tiempo de retención hidráulica (HRT) a 4 h, resultó en la desaparición casi completa de los gránulos más ligeros, probablemente asociados al efecto del aumento de la velocidad superficial sobre la expansión del lecho.

En el caso de aguas residuales ricas en disolventes, la exposición al lodo granular causa erosión y/o fragmentación granular y filamentos, promoviendo el lavado de biomasa activa. Además, el flujo de aguas residuales de los procesos industriales suele interrumpirse debido a los turnos de trabajo en la fabricación, lo que puede tener un efecto adverso en la granulación. Por lo tanto, en gran medida, la expansión de la tecnología RALF para el tratamiento de aguas residuales con disolventes depende de su capacidad para mantener la estructura de lodos granulares dentro del reactor; y este inconveniente debe superarse. Se han investigado varias estrategias para estimular la granulación de biomasa en biorreactores anaeróbicos de alta tasa. Los polímeros naturales o sintéticos han sido descritos anteriormente como promotores efectivos de la granulación de biomasa en reactores RALF. Entre ellos, los polímeros naturales han demostrado una mayor eficiencia debido a su estructura polisacárida.

Se ha descubierto que el Chitosán mejora la granulación, lo que conduce a la retención de gránulos más grandes y lodos de mayor densidad en el reactor. Por otra parte, el uso de Chitosán puede prevenir el lavado metanogénico debido a la formación de una capa hidrófila elástica y

de una base interna hidrofóbica. También se prefiere el Chitosán porque no es tóxico, es biodegradable y respetuoso con el medio ambiente. La eficacia del Chitosán para la floculación depende de varios factores, como el grado de desacetilación (DD) y el peso molecular. Por ejemplo, estudios previos han reportado que la floculación usando Chitosán con un 85% de DD fue más efectiva que con Chitosán con 70% de DD. Otros autores han señalado que usar Chitosán en solución es más eficaz que usarlo como granos o polvo. Los efectos de la adición de Chitosán en la retención de biomasa y la capacidad de remoción de un reactor de RALF, es utilizado para tratar una mezcla de disolventes que contiene contaminantes de modelos de etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol.

Por primera vez se probó el efecto sobre la retención de biomasa de varias velocidades de líquido y cargas orgánicas, representativas de una operación a escala industrial, utilizando lodos parcialmente desgranulados durante el tratamiento de aguas residuales con disolventes (Lafita, San-Valero, Marzal, Penya-roja, & Gabaldón, 2017).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

El objetivo principal de esta investigación consiste en evaluar la formación de biomasa granular en dos reactores anaerobios alimentados de manera intermitente con agua residual contaminada con disolventes orgánicos en presencia del polímero Chitosán, así como comprobar la actividad metanogénica del fango formado.

### 2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta investigación se muestran a continuación:

- Determinar la dosis óptima del polímero Chitosán
- Determinar el efecto de la adición del Chitosán
- Observar el rendimiento de los reactores anaerobios con alimentación intermitente de sustrato orgánico
- Evaluar la evolución del tamaño de partícula durante el experimento
- Estudiar la eficacia de eliminación del sustrato orgánico
- Determinar la cantidad de metano producido en los reactores
- Determinar la actividad metanogénica de los reactores

### 3. Material y Métodos

#### 3.1. Montaje experimental

En este estudio se emplearon dos reactores a escala de laboratorio, un reactor tipo RAFA (Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente) a la izquierda de la ilustración y el otro RALF (Reactor Anaerobio de Lecho Fluidizado) a la derecha de la ilustración 5.



*Ilustración 5 Montaje experimental a escala de laboratorio del reactor RAFA y RALF*

Dimensiones de los reactores:

En estos reactores, median 172 cm de alto, 6,5 cm de diámetro en su parte más baja, 20 cm en la parte más ancha que constituía el decantador y un volumen de 7,805 litros.

Esquema de montaje:

Las ilustraciones 6 y 7 muestran los detalles y la configuración de los reactores

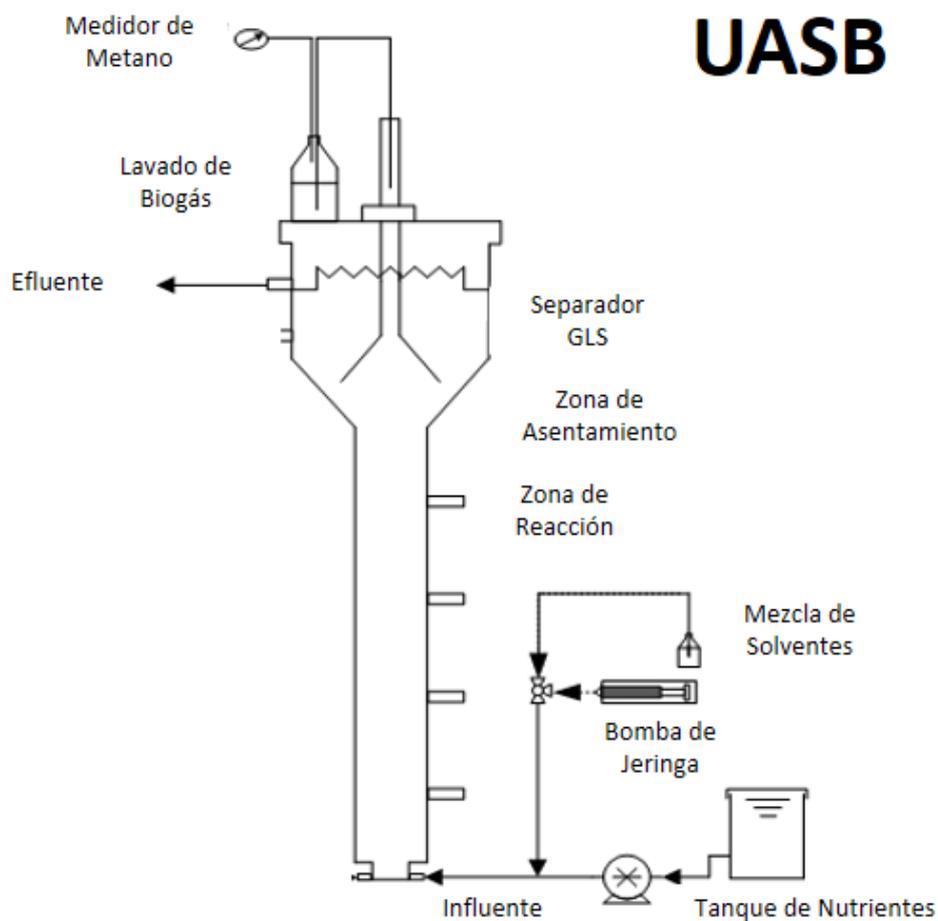


Ilustración 6 Esquema de montaje experimental del reactor RAFA (UASB)

## EGSB

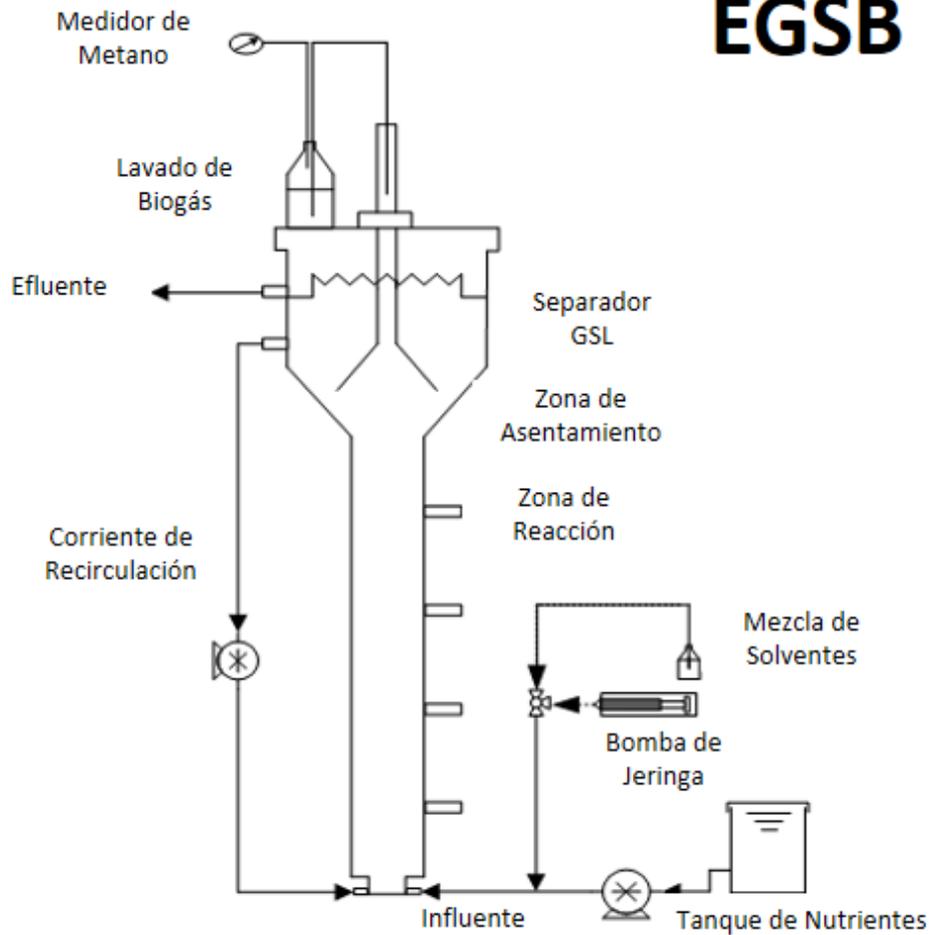


Ilustración 7 Esquema de montaje del reactor RALF (EGSB)

En el reactor RAFA o UASB, el agua residual sintética con mezcla de nutrientes entraba en el reactor por la parte inferior del reactor donde se encontraba el lecho del fango. Las bombas que controlaban los caudales de circulación del alimento se calibraban cada poco tiempo para introducir la carga orgánica correspondiente. En la parte más ancha del reactor se encontraban diferentes elementos tal y como se puede observar en la ilustración 6; el separador gas-liquido-sólido y la salida del efluente a través de los deflectores en la parte superior.

El reactor RALF o EGSB, presentaba una configuración igual que el reactor RAFA, pero con la única peculiaridad de que el agua de salida se recirculaba mediante una bomba y se introducía otra vez en el reactor por la parte inferior mezclándose con el agua residual a tratar (ilustración 7).

El montaje experimental consta además de: bombas de alimentación en la ilustración 8, bomba de jeringa en la ilustración 9, tanque de nutrientes en la ilustración 10 y medidor de caudal de biogás en ilustración 11.

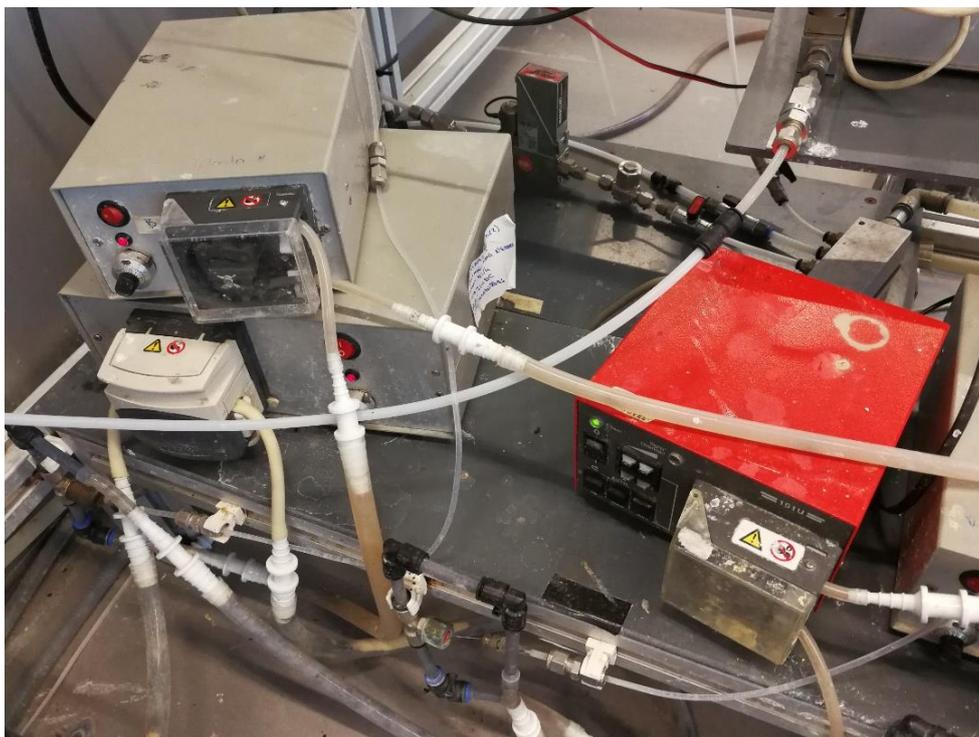


Ilustración 8 Bombas de entrada de nutrientes. Bomba de color rojo corresponde a RAFA. Bomba arriba a la izquierda entrada de RALF y bomba abajo a la izquierda recirculación de RALF

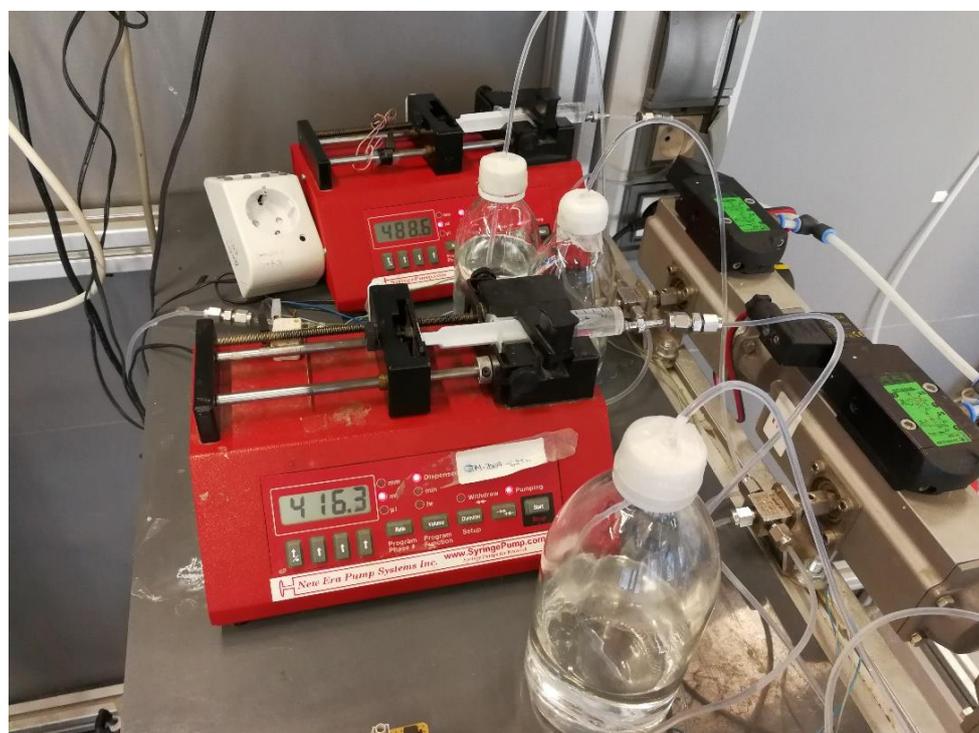


Ilustración 9 Bomba de entrada de sustrato orgánico. Mezcla de disolventes en las botellas



*Ilustración 10 Tanque de nutrientes (Azul)*

La corriente de entrada de cada reactor procede de un tanque de agua al que se añaden nutrientes y alcalinidad, y es impulsado mediante bombas peristálticas. El agua se contaminaba con la mezcla de disolventes a tratar mediante inyección en la conducción del caudal adecuado de mezcla.

En la parte estrecha del reactor el flujo es ascendente y fluye a través de un manto de lodos llevándose a cabo de esta forma el tratamiento del agua residual en la zona de reacción. El biogás producido en condiciones anaerobias (principalmente metano y dióxido de carbono), el lodo y el líquido a tratar ascienden a la parte superior del reactor, que pasando al separador gas-líquido-sólido, que permite la separación del biogás, capturado en la campana, y la sedimentación del lodo.

El biogás capturado se conduce hasta un frasco lavador con sosa en una concentración 3M, para absorber el dióxido de carbono producido. De esta forma el metano es el único gas que se conduce a un medidor de caudal de gas. Esta medida se ha realizado semanalmente en los dos reactores durante periodos de 2 a 4 horas, por lo que los resultados obtenidos son medidas instantáneas de la producción de metano. En la ilustración 11 se muestra el frasco lavador.



*Ilustración 11 Salida del biogás*

El sustrato introducido con el alimento era una mezcla de Etanol, Acetato de Etilo y 1-etoxi-2-Propanol en una proporción 3,5:1:0,5 en masa. La inyección se realizaba con el caudal requerido para alcanzar la carga orgánica deseada.

Para favorecer la granulación del fango se utilizó Chitosán. Previamente se realizó un estudio de Jar-Test para calcular la dosis óptima de este polímero que más adelante se mostrará. La dosis de Chitosán se introducía semanalmente en la misma cantidad para los dos reactores.

### 3.2. Inóculo

El inóculo fue un fango anaerobio en suspensión procedente del digester de la EDAR de Quart Benager. Las características iniciales del inóculo son las mostradas en la tabla 1. Este inóculo presentaba una actividad metanogénica específica (AME) de 54 mL CH<sub>4</sub>/gVSS·d.

Tabla 1 Características del inóculo

CARACTERÍSTICAS DEL INÓCULO		
Fango Quart Benager		
SST	17	g/L
SSV	9	g/L
Alcalinidad	3547	mgCaCO <sub>3</sub> /L
AGV	15	mgAA/L
Conductividad	7,68	mS/cm
pH	7,69	
T	38	°C
AME	54 ± 2,1	mL CH <sub>4</sub> g VSS <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
IVF	112	ml/gSST
Tamaño partícula >300µm	5,72	%
75%	105	µm
20%	275	µm
5%	550	µm

### 3.3. Composición del agua residual sintética

La composición del agua residual sintética de entrada variará a lo largo del experimento, ya que, irá aumentando la carga orgánica y por tanto la cantidad de nutrientes a adicionar.

Tabla 2 Formulación de la composición de la alimentación

FORMULACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE NUTRIENTES DE LA ALIMENTACIÓN					
DQO/N (gDQO/gN)	150	FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O (mg/L)	5,260	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (mg/L)	2,019
DQO/P (gDQO/gP)	300	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (mg/L)	1,429	NiSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O (mg/L)	0,559
DQO/Ca (gDQO/gCa)	312	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (mg/L)	0,165	EDTA sódica (mg/L)	1,25
DQO/Mg (gDQO/gMg)	312	CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (mg/L)	0,168	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mg/L)	0,472
DQO/K (gDQO/gK)	800	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (mg/L)	1,801	Levadura (g/gDQO)	0,0075
NaHCO <sub>3</sub> (g/L)	5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 2H <sub>2</sub> O (mg/L)	0,781		

El agua de entrada está compuesta por:

**Macronutrientes:**

- **Amonio, Fosforo y potasio** se dispone de una solución concentrada industrial de nutrientes conocida (tabla 3), a partir de ésta, se obtiene la cantidad necesaria que debe introducirse en el tanque de alimentación para conseguir la carga orgánica deseada.

Tabla 3 Solución concentrada de Macronutrientes

MACRONUTRIENTES	Solución concentrada g/L
NH <sub>4</sub> Cl	15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,373
KCl	1,404

A modo de ejemplo, si se desea una carga orgánica de 13 kg DQO/m<sup>3</sup>·d y un TRH de 15,4h, se debe adicionar 776,69 ml de dicha solución, como refleja la tabla 4:

Tabla 4 Ejemplo de adición de Macronutrientes

MACRONUTRIENTES	Sln concentrada g/L	mg nutriente/g DQO	mg nutriente/día	ml nutriente/día	ml nutriente/L	ml en tanque de solución
NH <sub>4</sub> Cl	15	25,46	2583,25	172,2169	14,12	776,69
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,373	14,21	1442,00	172,2170	14,12	
KCl	1,404	2,38	241,82	172,2170	14,12	

- **Calcio y magnesio**, para obtener los requerimientos nutricionales de los microorganismos respecto al calcio y magnesio se utilizó como referencia bibliográfica (Torres, Alvarez-Hornos, San-Valero, Gabaldon, & Marzal, 2017). La composición de las soluciones industriales se muestra en la tabla 5:

Tabla 5 Solución (Sln) concentrada de Calcio y Magnesio

MACRONUTRIENTES	Sln concentrada g/L	Requerimiento mg nutriente/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	58,80	366,80
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	133	334,50

**PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN**

A modo de ejemplo, si se desea una carga orgánica de 13 kg DQO/m<sup>3</sup>·d y un TRH de 15,4h, se debe adicionar 343,09 ml de CaCl<sub>2</sub> y 138,33ml de MgCl<sub>2</sub> de cada solución, como refleja la tabla 6:

*Tabla 6 Ejemplo de adición de Calcio y Magnesio*

MACRONUTRIENTES	Sln concentrada g/L	Requerimiento mg nutriente/L	ml/L	ml en tanque de solución
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	58,80	366,80	6,24	343,09
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	133	334,50	2,52	138,33

**Micronutrientes**, para obtener los requerimientos nutricionales de los microorganismos respecto a micronutrientes se utilizó como referencia bibliográfica (Torres, Alvarez-Hornos, San-Valero, Gabaldon, & Marzal, 2017). La composición de la solución industrial de micronutrientes se muestra en la tabla 7:

*Tabla 7 Solución concentrada de Micronutrientes*

MICRONUTRIENTES	Sln concentrada g/L	mg nutriente/g DQO
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,5780	0,4208
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,4288	0,1143
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0495	0,0132
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0503	0,0134
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,5404	0,1441
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,2344	0,0625
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2230	0,0595
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,6056	0,1615
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1678	0,0447
EDTANa <sub>2</sub>	0,3750	0,1000

A modo de ejemplo, si se desea una carga orgánica de 13 kg DQO/m<sup>3</sup>·d y un TRH de 15,4h, se debe adicionar 122,03 ml de dicha solución, como reflejan los datos obtenidos en la tabla 8:

**PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN**

*Tabla 8 Ejemplo de adición de Micronutrientes*

MICRONUTRIENTES	Sl <sub>n</sub> concentrada g/L	mg nutriente/ g DQO	mg nutriente/ día	ml nutriente/ día	ml nutriente/L	ml en tanque de solución
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,5780	0,4208	42,696	27,0573	2,2187	<b>122,03</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,4288	0,1143	11,597	27,0463	2,2178	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0495	0,0132	1,339	27,0573	2,2187	
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0503	0,0134	1,360	27,0304	2,2165	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,5404	0,1441	14,621	27,0561	2,2186	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,2344	0,0625	6,342	27,0544	2,2184	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2230	0,0595	6,037	27,0725	2,2199	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,6056	0,1615	16,387	27,0585	2,2188	
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1678	0,0447	4,535	27,0291	2,2164	
EDTANa <sub>2</sub>	0,3750	0,1000	10,147	27,0573	2,2187	

**Alcalinidad**, la cantidad de solución industrial a añadir se obtiene multiplicando la concentración requerida por el volumen del tanque de alimentación, tal como muestra la tabla 9:

*Tabla 9 Concentración requerida de Alcalinidad*

ALCALINIDAD	Concentración requerida g/L	g en solución
NaHCO <sub>3</sub>	5	<b>275.0</b>

**Levadura**, para obtener los requerimientos nutricionales de los microorganismos respecto a la levadura se utilizó como referencia bibliográfica (Torres, Alvarez-Hornos, San-Valero, Gabaldon, & Marzal, 2017). Tabla 10.

*Tabla 10 Concentración requerida de Levadura*

Levadura	mg Levadura /g DQO requeridos
Extracto de levadura	7,5

A modo de ejemplo, si se desea una carga orgánica de 13 kg DQO/m<sup>3</sup>·d y un TRH de 15,4h, se debe adicionar 3432mg de levadura, como reflejan los datos obtenidos en la tabla 11:

Tabla 11 Ejemplo de adición de la Levadura

Levadura	mg Levadura /g DQO requeridos	mg Levadura/d	mg Levadura/L	mg en tanque de solución
Extracto de levadura	7,5	760,99	62,4	3432

### 3.4. Métodos analíticos

#### 3.4.1. Determinación del pH y la conductividad

Para la determinación del pH y la conductividad se extraían muestras del efluente de los reactores los lunes, miércoles y viernes a las 11 de la mañana. Estas medidas son de vital importancia debido a que indican si los reactores están funcionando correctamente. Las sondas eran las pH/Cond 3401 de WTW GmbH (Alemania).

#### 3.4.2. Determinación de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles

Se utilizó el método de valoración ácido-base de Moosbrugger et al (1992) para la determinación de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles de las muestras del efluente extraídas los lunes, miércoles y viernes a las 11 de la mañana. Las dos medidas se realizaban con el valorador automático Tritino Plus 848 (Metrohm, Suiza). La información proporcionada de los volúmenes de valoración del Tritino se introducía en el programa informático "Valora" obteniéndose el valor de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles, que también son de vital importancia ya que indica si el reactor está funcionando con una carga orgánica adecuada para ese momento. Previo a la determinación se procedía a la centrifugación de la muestra para eliminar los sólidos. Se utilizó una centrifuga marca eppendorf modelo Centrifuge 5804 para sedimentar los sólidos que hayan salido en el efluente.

#### 3.4.3. Determinación de la DQO

Para la determinación de la DQO o COD se extraían muestras del efluente dos veces por semana, lunes y viernes a las 11 de la mañana. El método utilizado era el método colorimétrico según Standard Methods 5220D. Se empleaban cubetas Spectroquant 114540, Spectroquant de Merck KGaA, Alemania. El digestor empleado era el modelo Spectroquant TR 420 y el espectrofotómetro que mide la absorbancia era el modelo SpectroFlex 6600, los dos equipos de Merck KGaA, Alemania.

El análisis del Carbono orgánico, inorgánico y total de las muestras se realizó con el instrumento Total Organic Carbon Analyzer TOC-VC-chs de Shumazu Corporation, Kyoto (Japón).

#### 3.4.4. Determinación de los disolventes orgánicos

Para la determinación de los disolventes orgánicos se extraían muestras del efluente de los reactores dos veces por semana, lunes y viernes a las 11 de la mañana. El método utilizado era la cromatografía de gases. Se empleó el cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890A de la empresa OC System.

#### 3.4.5. Determinación del caudal de metano

Para determinar el caudal de metano producido en la degradación de la materia orgánica, el caudal era conducido por la parte superior de los reactores y se llevaba hasta un frasco lavador con sosa 3M. La sosa absorbía el dióxido de carbono eliminándolo y dejando en exclusiva el metano para poder ser medido. La medida del caudal de metano se realizaba 3 veces por semana durante varias horas para cada reactor (de 2 a 4 horas) con el equipo Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II) de BioProcess Control, Suecia y más adelante con el equipo Rigamo. Ver ilustración 12.



Ilustración 12 BioProcess (arriba) y Rigamo (abajo) para la medida del caudal de metano

#### 3.4.6. Determinación de la composición del biogás

La determinación de la composición del biogás producido se realizó extrayendo biogás con una jeringuilla directamente de la salida de gases. El análisis de la composición del biogás se realizaba mediante el cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7820A de la empresa OC System donde se comprobaba la concentración de los diferentes componentes del biogás entre ellos el metano, dióxido de carbono y ácido sulfhídrico.

#### 3.4.7. Determinación de la sedimentabilidad del fango inóculo

Para la evaluación de la sedimentabilidad del fango inóculo se utilizaron los parámetros IVF y velocidad de sedimentación, según los métodos descritos en el Standard Methods. Se utilizó conos volumétricos, introduciendo 1 litro de fango en un cono volumétrico y midiendo el volumen que ocupa el fango a los 30 min para el índice volumétrico del fango.

El IVF se calculó como se muestra a continuación:

$$IVF \left( \frac{ml}{g} \right) = \frac{\text{Volumen de fango sedimentado} \left( \frac{ml}{l} \right) * 1000}{\text{Sólidos suspendidos totales} \left( \frac{mg}{l} \right)}$$

#### 3.4.8. Medida de la turbidez

Para la medida de la turbidez se utilizó un turbidímetro del modelo Turbiquant 1500 IR de la marca Merck Millipore, Alemania.

#### 3.4.9. Determinación de la concentración de sólidos

La determinación de los sólidos, totales, suspendidos totales y suspendidos volátiles se realizó siguiendo los métodos descritos en el manual Standard Methods.

Se extrajeron muestras del reactor una vez a la semana, los miércoles.

Para la determinación de los sólidos suspendidos, en primer lugar, se pesa la cápsula de porcelana con el filtro de tamaño de poro de 0,45 µm de fibra de vidrio y se anota el valor del peso como peso inicial (Pi). En la extracción de la muestra, se extrae un volumen conocido en

un vial (V) y esta es filtrada en vacío a través del filtro, que anteriormente se había pesado con la cápsula.

Posteriormente la cápsula, el filtro y los sólidos suspendidos se llevan a una estufa y se deja entre una y dos horas a 105,5 °C.

Tras este periodo de tiempo la cápsula se deposita en un desecador para equilibrar su temperatura y peso. Cuando ya está fría se vuelve a pesar (Pf) y se anota el dato.

El cálculo de la concentración de sólidos suspendidos se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$SS = \frac{(Pf - Pi)}{V} \left(\frac{g}{l}\right) \text{ o } \left(\frac{mg}{l}\right)$$

A continuación, se lleva la cápsula a la mufla para someterla a una temperatura de 550°C durante dos horas. Tras dejar enfriar la cápsula en el desecador se vuelve a pesar (P mufla).

El cálculo de la concentración de sólidos suspendidos volátiles se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$SSV = \frac{(Pf - P \text{ mufla})}{V} \left(\frac{g}{l}\right) \text{ o } \left(\frac{mg}{l}\right)$$

Donde:

$$\%SSV = \frac{SSV * 100}{SS}$$

Los sólidos suspendidos volátiles en porcentaje representan la proporción respecto a los sólidos suspendidos. Este valor da una idea aproximada de la cantidad de materia orgánica que puede ser biodegradable en la muestra de fango.

#### 3.4.10. Distribución del tamaño de partícula del fango

Este parámetro se determinó mediante el analizador de tamaño de partícula Mastersizer 2000 de Malvern (Reino Unido) de muestras de fango extraídas del reactor una cada tres semanas. Estas muestras eran analizadas en el Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

#### 3.4.11. Ensayo de la actividad metanogénica específica

Para este ensayo se utilizó el equipo BioProcess Control (Suecia). Este ensayo se realizó al final del experimento utilizando el fango de los dos reactores.

En este ensayo se preparaba una muestra de fango con su sustrato sintético y con nutrientes en un reactor de 600 ml, con un volumen de fango y sustrato de 400 ml. Los 200 ml restantes se llenaban de nitrógeno gas con el fin de desplazar el aire que contenía la muestra.

El sustrato sintético tenía la concentración de nutrientes descrita anteriormente, una cantidad de sustrato de 3 gDQO/l, donde la cantidad de sustrato era de 1,2 gDQO y la cantidad de inóculo era de 2,5 gSSV. La mezcla de disolventes era 3,5:1:0,5 Etanol, acetato de etilo y 1-metoxi-2-propanol.

El ensayo se realizaba en un baño termostático a 25°C con agitación cada 60 segundos, los dos ensayos tienen la misma dosis sin ninguna diferencia, pero separados para comprobar la actividad metanogénica específica de cada uno. Ver ilustración 13.



*Ilustración 13 Ensayo de actividad metanogénica*

Para la medida del caudal de metano, el biogás producido se hacía pasar por una solución de sosa 3M para la eliminación del dióxido de carbono; tras el paso por los frascos se medía el número de impulsos que mostraba la célula de medida correspondiente a cada reactor.

## 4. Procedimiento Experimental

### 4.1. Determinación de la dosis óptima de Chitosán

Para la determinación de la dosis óptima del Chitosán se realizó un ensayo de Jar-Test al inicio del experimento (ver ilustración 14). Se ensayaron dosis de Chitosán de 4,053 mg/gSSV, 8,105 mg/gSSV, 12,158 mg/gSSV, 16,211 mg/gSSV, 20,263 mg/gSSV y un blanco donde no se aportó Chitosán y dosis en volumen de 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml y 10 ml.



*Ilustración 14 Ensayo de Jar-Test*

Se empleó un agitador múltiple de seis palas; el tiempo de mezcla y la velocidad de agitación se estableció en dos minutos a 190 rpm para permitir una mezcla homogénea del fango y el polímero Chitosán, y una mezcla lenta de una hora de agitación a 30 rpm. El equipo está dotado de un controlador de la velocidad de agitación y de un sistema de iluminación para visualizar la formación de gránulos en las mismas condiciones de mezcla en todos los vasos. Ver ilustración 15.



*Ilustración 15 Ensayo Jar-Test con fango*

Para la determinación de la dosis óptima de Chitosán se realizaron los siguientes pasos:

- Se llenaron los 6 vasos de precipitados con 1 litro de muestra de fango. En un vaso aparte se tendrá la muestra que no se tratará con coagulante.
- Se colocaron los vasos sobre el agitador múltiple y se introdujeron los agitadores de forma que estuvieran en el centro de cada vaso.
- Se puso el agitador en marcha a una velocidad de 190 rpm y se mantuvo durante dos minutos.
- Durante el periodo de agitación rápida se introdujo en cada uno de los vasos las cantidades crecientes ya mostradas anteriormente de Chitosán.
- Después de los dos minutos se redujo la velocidad a 30 rpm (mezcla lenta). Se mantuvo esta velocidad durante una hora. Se anotó cada 5 minutos el tamaño relativo del floculo (grande, pequeño, mediano, etc.).
- Pasados los 60 min se vertió el contenido de cada vaso en un cono Imhoff y se dejó decantar durante media hora (ver ilustración 16).
- En la zona intermedia del líquido sobrenadante se midió el pH, la conductividad y la turbidez a los 20 y 30 minutos.
- A los 30 minutos se anotó el volumen de fango sedimentado.



Ilustración 16 Conos Imhoff con fango decantado

Gracias a estos ensayos se pudo decidir cuál era la dosis óptima de Chitosán para el fango que posteriormente se añadió a los reactores.

#### 4.2. Seguimiento del proceso de granulación y la operación de los reactores

Los reactores se sembraron con muestras de fango de Quart Benager, con un volumen de reactor de 7,8 litros cada uno. Por lo que respecta a la carga orgánica, ésta se introdujo en el reactor a partir de una mezcla 3,5:1:0,5 en masa de etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol, con una DQO de 1610,7 g/l que se inyectaba con la bomba de jeringa en la conducción de alimentación del agua para conseguir la carga orgánica deseada.

Los ensayos se llevaron a cabo en 4 fases, las tres primeras fases marcaban el aumento considerado de la carga orgánica y la última fase el cambio de inyección intermitente de sustrato orgánico a inyección continua de dicho sustrato. La operación de cada fase se muestra en la tabla 5. En la gráfica 1 y 2 muestra la variación de la carga orgánica (CO o OLR) para los RAFA y RALF respectivamente.

En el reactor RAFA se arrancó con una carga orgánica de 2,125 kg DQO/(m<sup>3</sup>-día) mientras que en el reactor RALF se aplicaba una carga orgánica de 1,425 kg DQO/(m<sup>3</sup>-día). La variación de la carga orgánica aplicada a los reactores se estableció según la concentración de ácidos grasos en el reactor.

A continuación, se muestra las condiciones iniciales de los dos reactores:

Tabla 12 Condiciones iniciales de los reactores

Condiciones iniciales		
Parámetros	RAFA	RALF
CO (kg DQO/m <sup>3</sup> -d)	2,125	1,425
TRH (horas)	48	48
DQO inicial (mg/L)	4250	2850
V <sub>ascenso</sub> (m/h)	0,05	3

En los dos reactores se fue aumentando la carga orgánica de forma progresiva hasta alcanzar un valor de 12 kg DQO/(m<sup>3</sup>-d) para el reactor RAFA y 13 kg DQO/(m<sup>3</sup>-d) para el reactor RALF. La evolución de la carga orgánica aplicada se estudiará más adelante en el apartado 5.4.1.

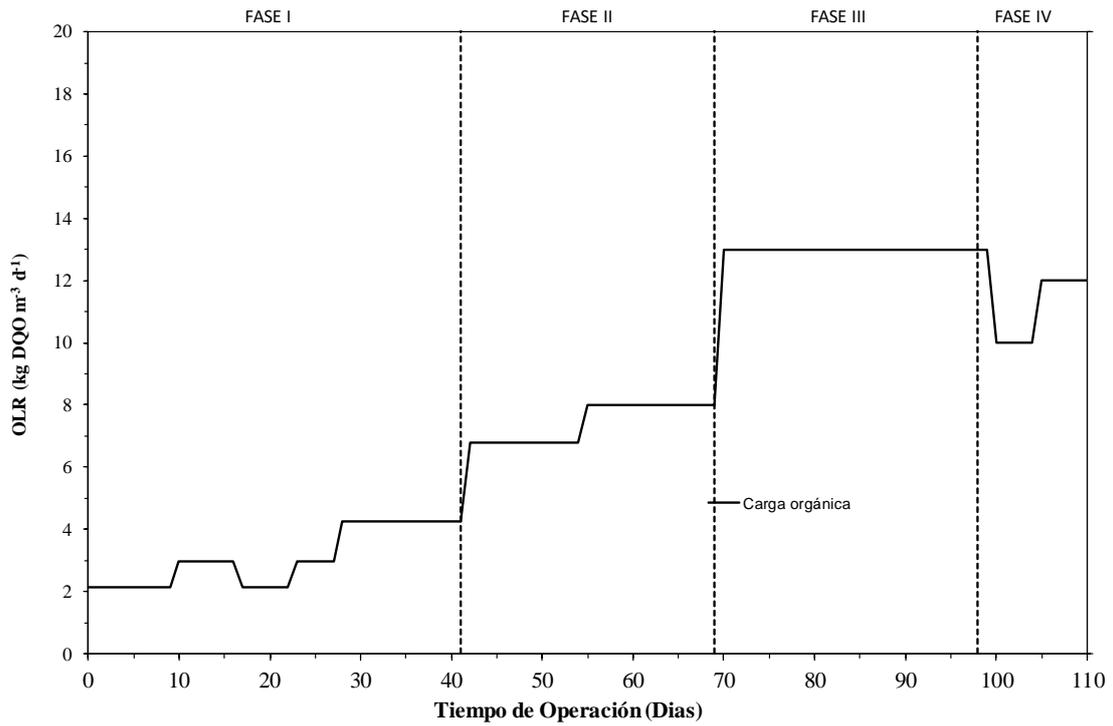
A continuación, en la tabla 5, se muestran los cuatro periodos que se dividió el experimento para los dos reactores, con los tres primeros periodos, se alimentó intermitente de 16 horas al día, todos los días de la semana, para simular los periodos de trabajo de las instalaciones industriales. Para el último periodo se mantuvo la carga orgánica, incluso reduciéndola para el reactor RAFA, pero con la peculiaridad de que el sustrato se alimentaba continuamente.

Tabla 13 Parámetros de operación de los reactores. (Q<sub>E</sub>: Caudal de entrada)

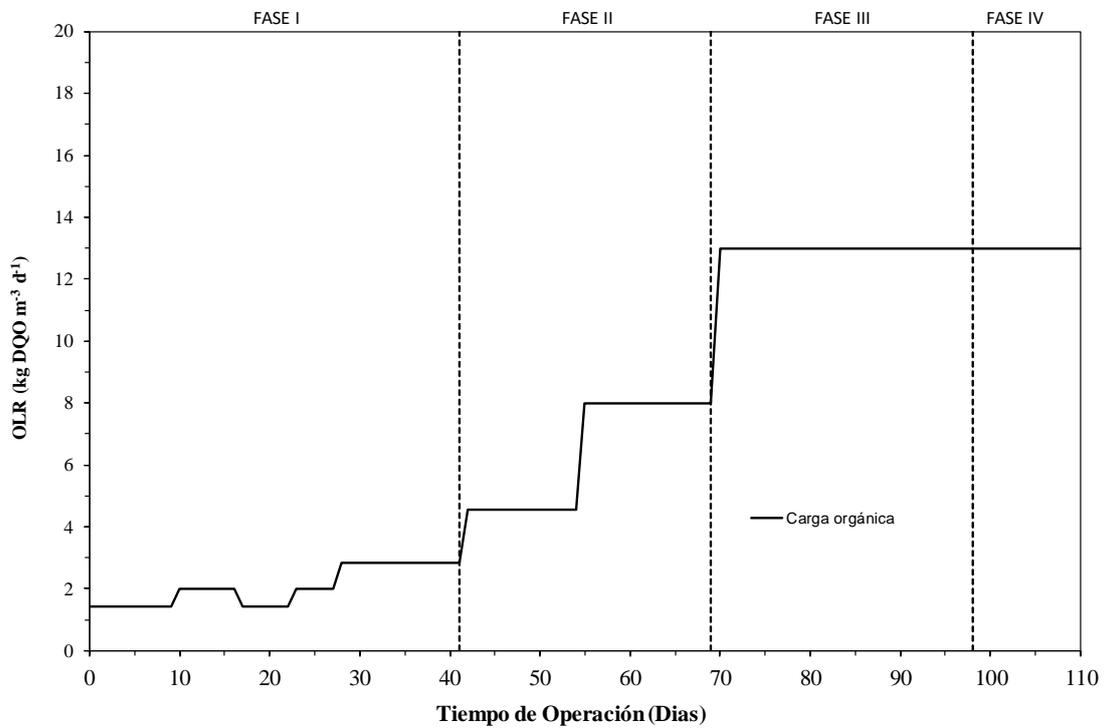
	Días de funcionamiento	Carga orgánica (kg DQO/m <sup>3</sup> -d)	DQO (mg/L)	Q <sub>E</sub> (L/d)	
RAFA	Fase 1	Fase 1 0 a 41	2,1-4,3	4250	3,9-7,8
	Fase 2	42 a 69	4,8-8	5440	9,8-12,2
	Fase 3	70 a 98	13	8320	12,2
	Fase 4	99 a 110	13-12	7680	12,2
RALF	Fase 1	0 a 41	1,4-2,9	2850	3,9-8,5
	Fase 2	42 a 69	4,6-8	3648	9,8-12,1
	Fase 3	70 a 98	13	8320	12,2
	Fase 4	99 a 110	13	8320	12,2

En los siguientes gráficos observamos la evolución de la carga orgánica (CO) o en inglés Organic Loading Rate (OLR) con sus cuatro periodos de funcionamiento y el tiempo de operación en días.

PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN



Grafica 1 Evolución de la carga orgánica y sus fases para reactor RAFA



Grafica 2 Evolución de la carga orgánica y sus fases para reactor RALF

Para el seguimiento de los reactores, se han realizado las siguientes analíticas en los periodos que a continuación se muestran:

*Tabla 14 Analíticas realizadas de los reactores RAFA y RALF*

<b>Parámetro</b>	<b>Periodicidad</b>
Temperatura	3 veces semana
pH	3 veces semana
Conductividad	3 veces semana
Alcalinidad	3 veces semana
Ácidos grasos volátiles	3 veces semana
Metano	2 veces semana
Composición biogás	2 veces semana
Disolventes	2 veces semana
DQO	2 veces semana
SS y SSV	1 vez semana
Carbono orgánico total	1 vez semana
Tamaño de partícula	1 cada 3 semanas
Adición Chitosán	1 vez semana

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Ensayo de Jar-Test

Para este ensayo se utilizó muestra del fango inicial que tenía una concentración de sólidos suspendidos totales de 8,880 g/L y una concentración de sólidos suspendidos volátiles de 4,935 g/L. El Chitosán tenía una concentración de 1g/100ml de disolución por lo que el volumen de Chitosán se añadió a cada vaso con un litro de fango, que se muestra en la tabla 7.

Una vez añadido el Chitosán a los vasos con los volúmenes correspondientes, se comenzó la observación visual de los vasos durante la agitación rápida sin apreciarse ningún flóculo. Al cabo de unos minutos, en la agitación lenta a 30 rpm, hasta alcanzar los 30 minutos, y a partir del tercer vaso hasta el último, aparecían flóculos pequeños y poco sedimentados.

Tabla 15 Dosis de Chitosán a cada vaso

	Vaso	Dosis Chitosán (mg/gSSV)	Dosis (ml)
<b>60 min</b>	1	0,00	0,0
	2	4,05	2,0
	3	8,11	4,0
	4	12,16	6,0
	5	16,21	8,0
	6	20,26	10,0

Para asegurar la floculación, se propuso aumentar el número de vasos y la dosis para confirmar la dosis óptima de Chitosán. En la tabla 8 se muestra los vasos séptimos, octavo y noveno.

Tabla 16 Dosis de Chitosán de los tres últimos vasos

	Vaso	Dosis Chitosán (mg/gSSV)	Dosis (ml)
<b>60 min</b>	7	24,32	12,0
	8	28,37	14,0
	9	32,42	16,0

En estos tres últimos vasos se observó flóculos mejor formados, pero con cantidades elevadas de Chitosán. Pasados 30 minutos se paró un minuto la agitación para comprobar si se apreciaba sedimentación del fango y la clarificada de cada uno de ellos. En la ilustración 17 y 18 se muestra el volumen sedimentado y la aparición de los flóculos en todo el vaso.



Ilustración 17 Vaso 6 de ensayo Jar-Test

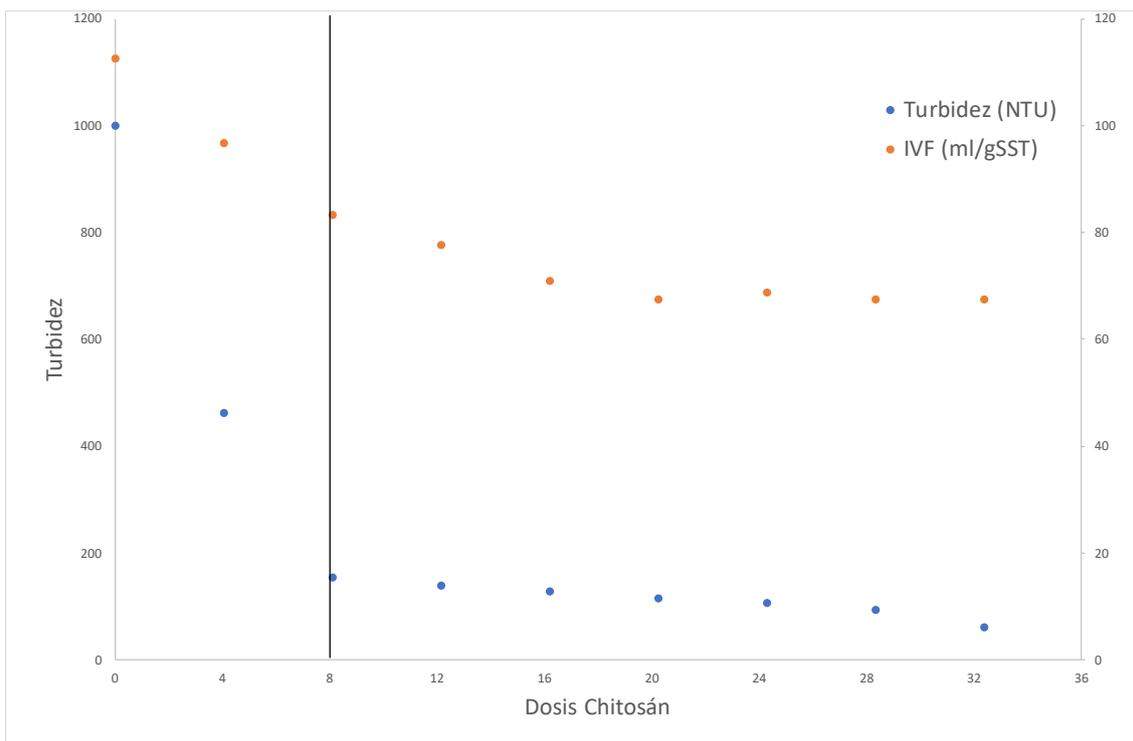


Ilustración 18 Vasos 7,8 y 9 del ensayo Jar-Test

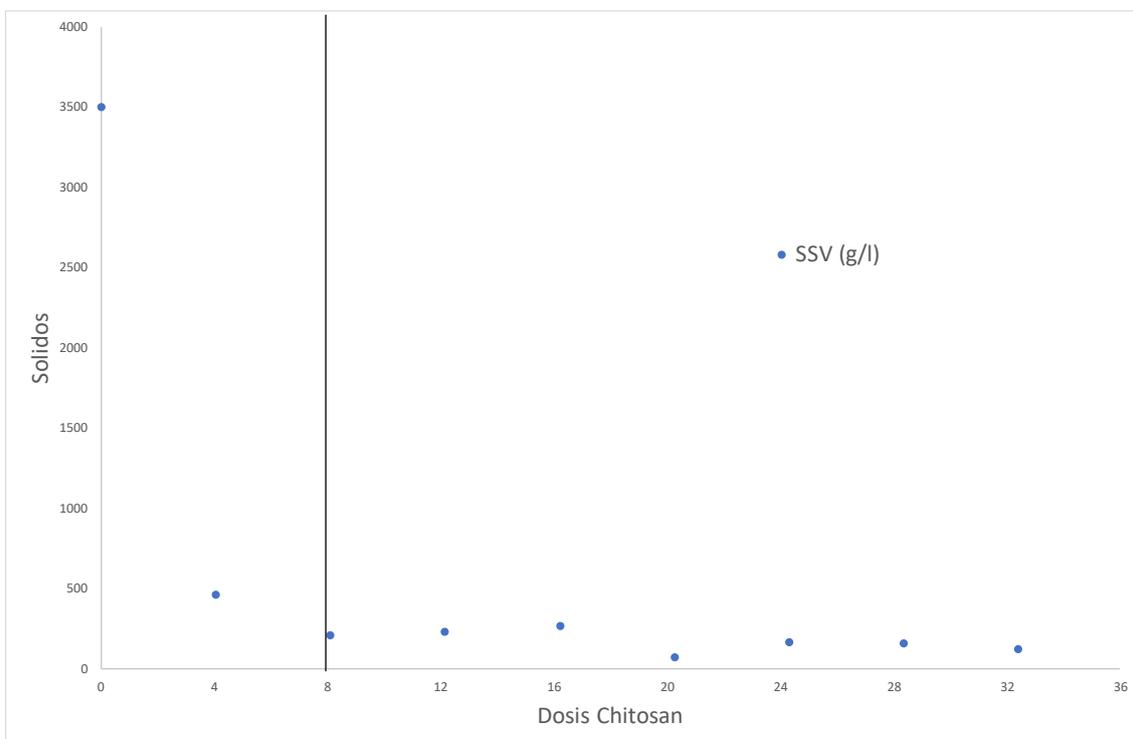
En los minutos siguientes los flóculos seguían mostrándose perfectamente de forma independiente y a simple vista. Tras una hora de agitación se pasó los contenidos de los vasos a los conos Imhoff para proceder a la lectura del volumen de fango sedimentado y a la toma de muestras del sobrenadante.

En la gráfica 3 se muestra la variación de la turbidez del sobrenadante y el IVF con la dosis de Chitosán añadida. Se muestra cómo disminuye la turbidez drásticamente hasta alcanzar los 8 mg Chitosán/gSSV, así como la disminución del índice volumétrico del fango (IVF). En la gráfica 4 se recoge los sólidos suspendidos del sobrenadante con la dosis de Chitosán añadida.

PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN



Grafica 3 IVF, Turbidez por cada dosis de Chitosán



Grafica 4 Sólidos suspendidos totales por cada dosis de Chitosán

Como se muestra en las dos gráficas anteriores (Gráfica 3 y 4), la turbidez y el IVF disminuyen con la cantidad de Chitosán administrada, ya que, como se esperaba, los resultados demostraron que, a mayor concentración, mayor agregación de las partículas del fango. Se hace evidente que una mínima adición del polímero produce una disminución de 800 NTU y una reducción del 65% del índice volumétrico del fango solamente con 8 mg Chitosán/gSSV. Por otro lado, en la gráfica 4, se ve una reducción considerable de los sólidos suspendidos totales en el sobrenadante hasta alcanzar su mínima dosis en la misma concentración de Chitosán.

A la vista de estos resultados, se fijó en 8 mg Chitosán/gSSV.

## 5.2. Puesta en marcha y operación de los reactores

Para la puesta en marcha de los reactores, estas se sembraron con las muestras de fango de Quart Benager de 4 litros y se completó todo su volumen con agua desionizada con bicarbonato sódico en una concentración de 5g/l para mantener la alcalinidad de los reactores en 3000 mg/l hasta completar los 7,805 litros de volumen de los reactores.

La carga orgánica se introdujo intermitentemente con la mezcla ya descrita de 3,5:1:0,5 en masa de etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol con una DQO inicial de 1.610 g/l que se introducía con el alimento sintético para conseguir la carga deseada.

En ambos reactores se trabajó incrementando la carga orgánica en el transcurso de la operación. La carga orgánica aplicada se estableció en función de la evolución de los ácidos grasos volátiles en el reactor.

El reactor RAFA arrancó con una carga orgánica de 2,125 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día) que aumentó de forma progresiva en el transcurso de las fases I, II y III hasta llegar a 13 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día) y en la última fase con adición continua de sustrato orgánico a una carga deseada de 10 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día) a 12 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día) en función de la evolución.

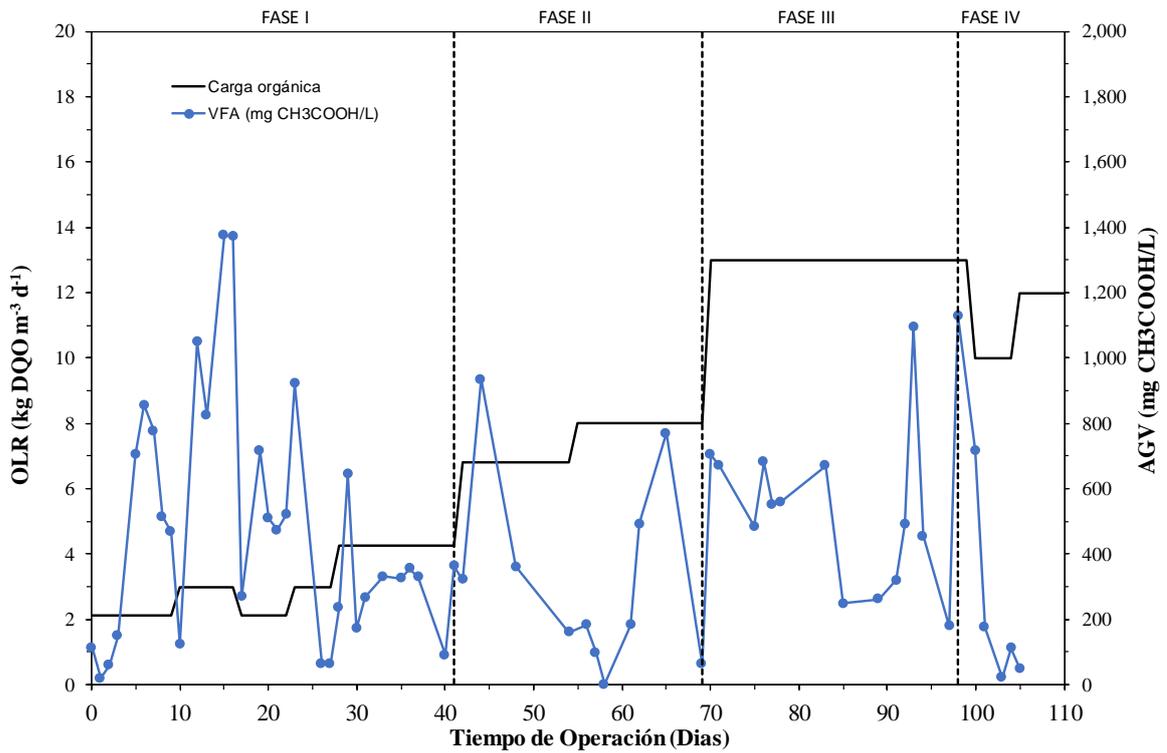
El reactor RALF arrancó con una carga orgánica de 1,425 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día) que se aumentó de forma progresiva hasta llegar a 13 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día). En la última fase con adición continua de sustrato orgánico se mantuvo la carga durante toda la fase.

La adición del Chitosán se realizó en ambos reactores a una misma dosis de 8 mg/gSSV una vez por semana durante todo el experimento en las cuatro fases de funcionamiento.

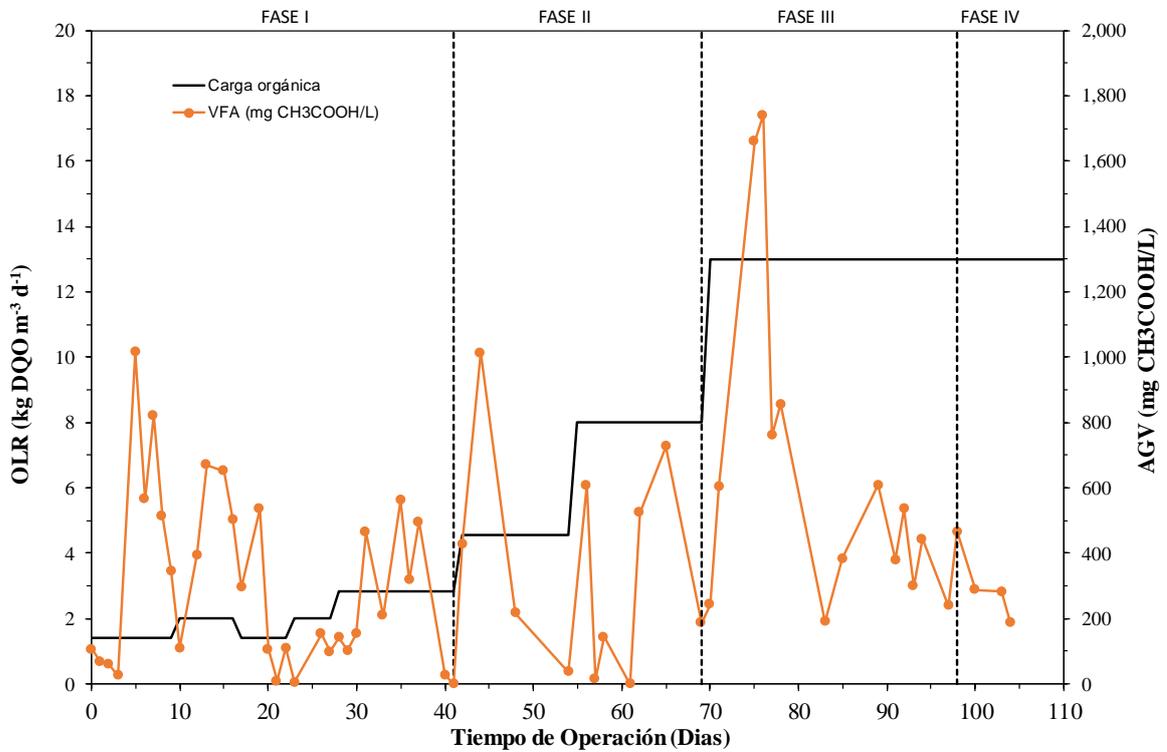
### 5.2.1. Carga orgánica aplicada y Ácidos Grasos Volátiles

En la gráfica 5 y 6 se muestra la carga orgánica aplicada (en inglés OLR) y la concentración de ácidos grasos volátiles en cada uno de los reactores en sus cuatro fases de funcionamiento.

PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN



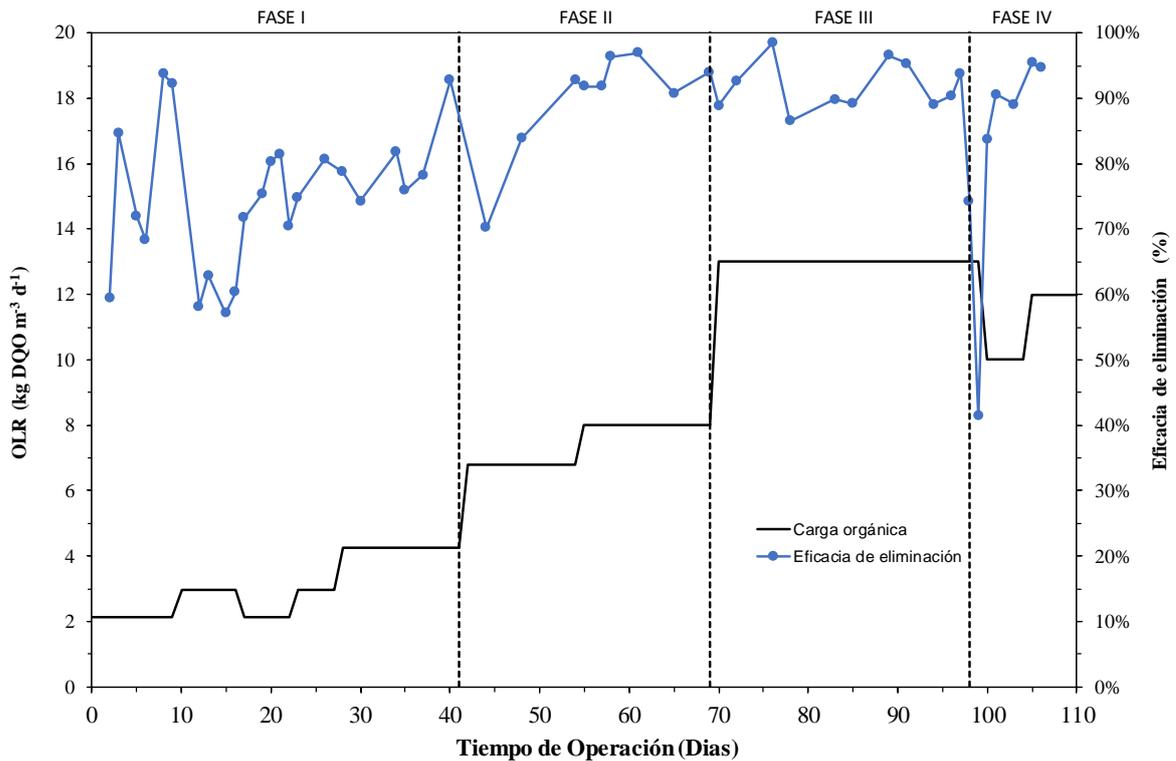
Gráfica 5 Carga orgánica vs Ácidos Grasos Volátiles (RAFA)



Gráfica 6 Carga Orgánica vs Ácidos Grasos Volátiles (RALF)

5.2.2. Eficacia de eliminación

La gráfica 7 y 8 se observa la eficacia de eliminación junto con la carga orgánica aplicada (en inglés OLR) durante el tiempo de funcionamiento en las cuatro fases para los reactores RAFA y RALF, respectivamente.



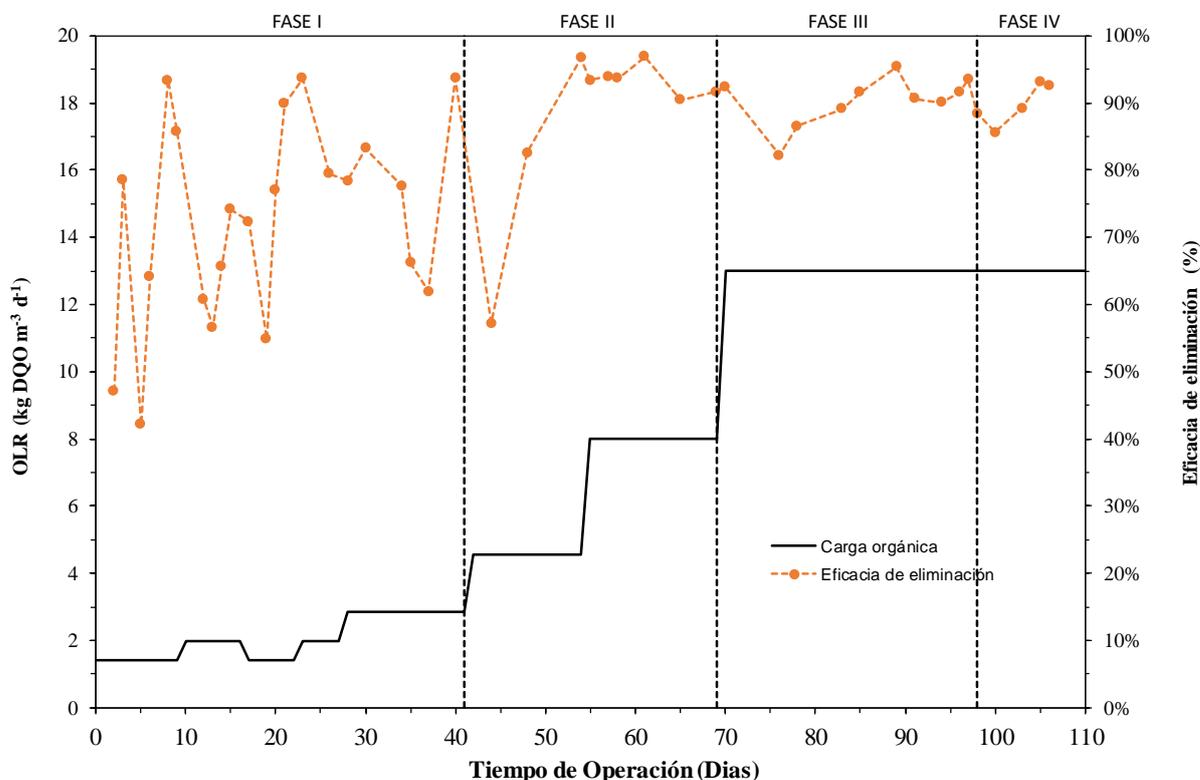
Gráfica 7 Carga Orgánica vs Eficacia de Eliminación (RAFA)

Durante la primera fase, las eficacias se encontraban entre el 60 y 90%, con disminución en respuesta a los incrementos de carga orgánica aplicada, mientras una tendencia creciente en la eficacia de eliminación, hasta alcanzar un valor de 95% al final de esta fase en el día 41. Se observa como en el día 10 la eficacia descendió por debajo del 60% en respuesta al primer incremento de carga.

Una vez alcanzadas eficacias de 95% se decidió aumentar la carga orgánica aplicada para la siguiente fase y en respuesta a esta descendió la eficacia de eliminación. Poco después la tendencia fue positiva hasta volver a alcanzar eficacias de 95%.

En la tercera fase, con un aumento de carga orgánica aplicada considerable, las eficacias de eliminación se mantuvieron entre el 85 y 95%

La última fase, en el día 98 la eficacia descendió drásticamente hasta el 40%, pero nuevamente se recuperó y alcanzó valores de 95% y superior debido al cambio de fase y con la inyección de sustrato en continuo.



Gráfica 8 Carga Orgánica vs Eficacia de Eliminación (RALF)

En el reactor RALF ocurrió prácticamente igual que en el reactor RAFA, aunque éste mantuvo eficacias de eliminación por encima del RAFA. Los únicos problemas ocurrieron en los días 10 y 41 debido al aumento de carga, pero rápidamente volvió a mantenerse en eficacias elevadas hasta alcanzar más del 90%.

La carga orgánica se introdujo con una contaminación de los compuestos orgánicos de etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol con una relación de 3,5:1:0,5 en masa. Según las fichas de seguridad (OECD) el etanol y el acetato de etilo es más fácilmente biodegradable que el 1-etoxi-2-propanol ya que para degradarlo es necesario la adaptación de la biomasa a este compuesto.

Con el fin de conocer la eficacia de eliminación de cada uno de los tres componentes se realizaron análisis cromatográficos de las muestras alimento y efluente de ambos reactores. En la tabla 17 muestra las concentraciones en el alimento durante todas las fases del experimento. El análisis de las muestras de efluente mostro la degradación total del etanol y del acetato de etilo, no así del 1-etoxi-2-propanol.

La concentración del reactor RAFA de etanol y acetato de etilo al inicio fue de 1460,55 mg/l y 417,30 mg/l respectivamente y para 1-etoxi-2-propanol fue de 208,65 mg/l. Y al final la concentración fue 2639,30 mg/l, 754,09 mg/l y 377,04 mg/l para etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol (E2P).

La concentración del reactor RALF de etanol y acetato de etilo al inicio fue de 979,43 mg/l y 279,84 mg/l respectivamente y para 1-etoxi-2-propanol fue de 139,92 mg/l. Y al final la concentración fue 2859,24 mg/l, 816,93 mg/l y 408,46 mg/l para etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol (E2P).

Tabla 17 Concentración de sustrato durante el periodo de funcionamiento de los reactores RAFA y RALF

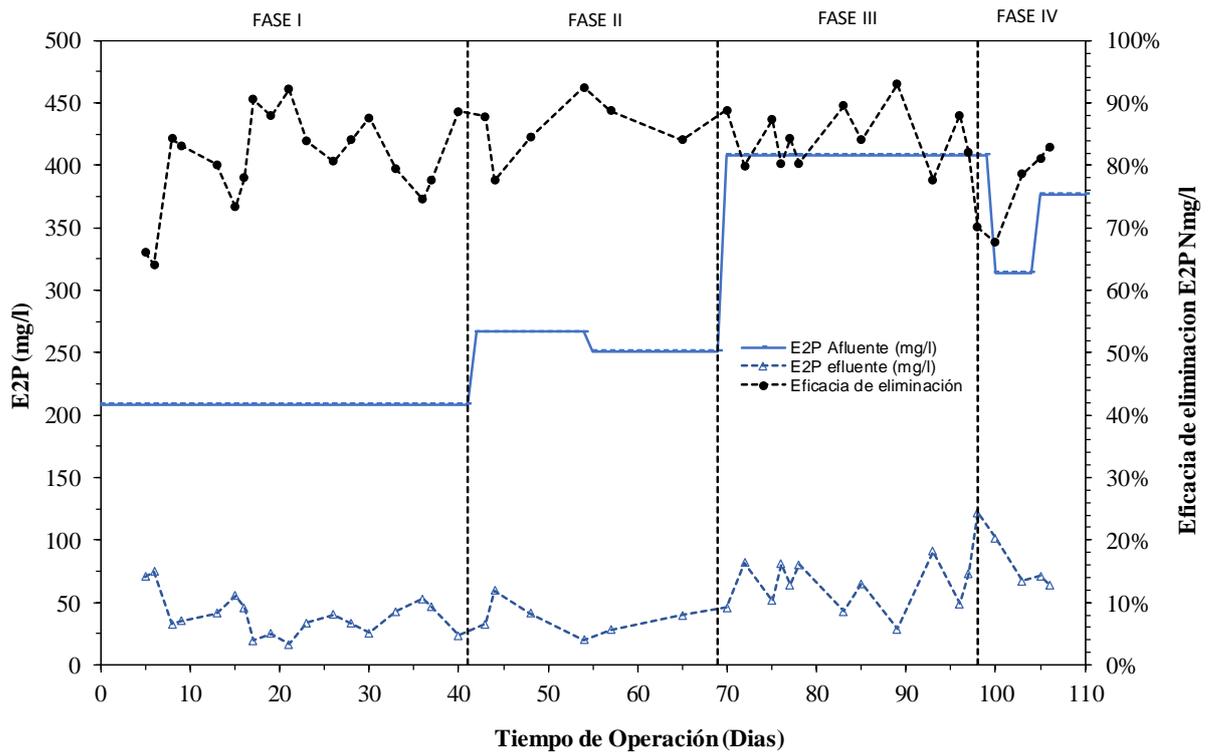
Día	RAFA (mg/l)			RALF (mg/l)		
	Etanol	Acetato de etilo	E2P	Etanol	Acetato de etilo	E2P
0	1460,55	417,30	208,65	979,43	279,84	139,92
17	1460,55	417,30	208,65	699,59	199,88	99,94
23	1460,55	417,30	208,65	685,60	195,89	97,94
28	1460,55	417,30	208,65	904,09	258,31	129,16
42	1869,50	534,14	267,07	1253,64	358,19	179,10
70	2859,24	816,93	408,46	2859,24	816,93	408,46
100	2199,42	628,40	314,20	2859,24	816,93	408,46
105	2639,30	754,09	377,04	2859,24	816,93	408,46

La degradación del etanol y el acetato de etilo es completa, por lo que se centrara más en el 1-etoxi-2-propanol (E2P). Si bien la degradación del compuesto no llegó a completarse en todo el periodo de funcionamiento, pero se consiguieron eficacias del 90%.

La gráfica 9 y 10 muestran la evolución de la concentración de 1-etoxi-2-propanol y la eficacia de eliminación del compuesto 1-etoxi-2propanol (E2P), por un lado, lo introducido en el afluente y extraído en el efluente, y por el otro lado, la eficacia de eliminación del disolvente orgánico del reactor RAFA y RALF, respectivamente. Se puede observar como en cada fase fue aumentando la concentración a la entrada del reactor, exceptuando la última fase debido a que la carga era demasiado alta, como reflejo el aumento en la concentración de ácidos grasos volátiles.

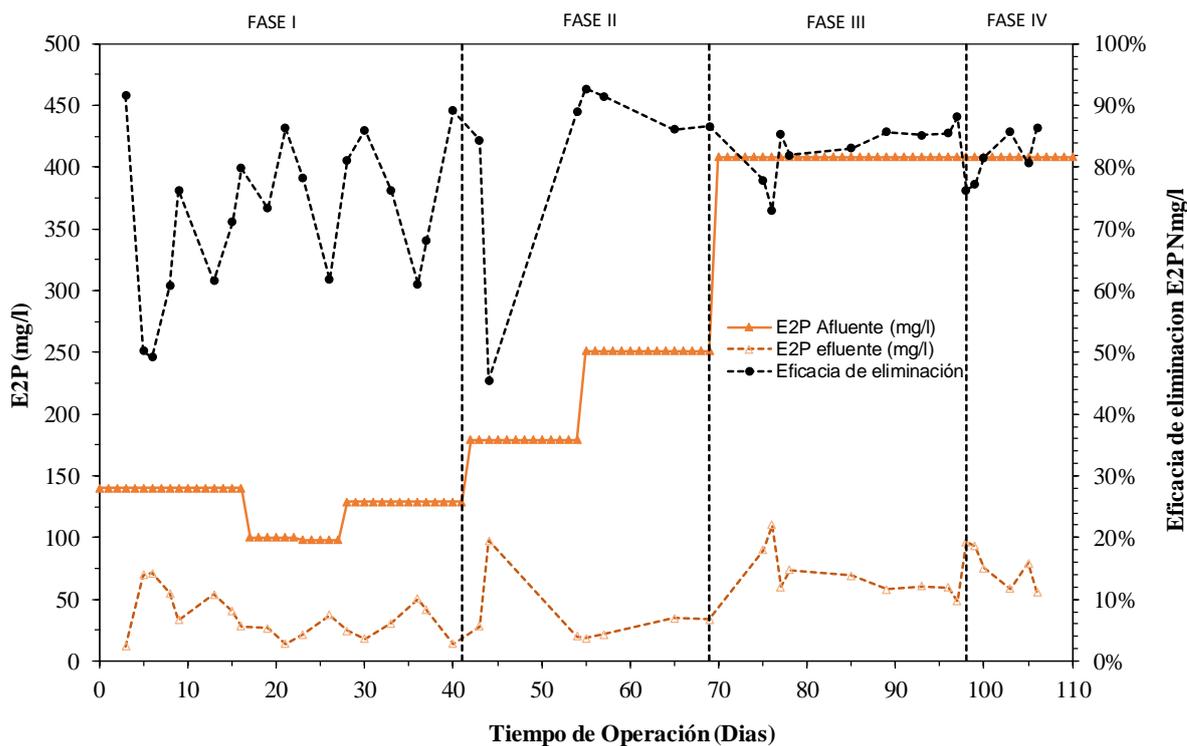
Se puede observar como la eficacia de eliminación del disolvente llegan a valores aproximados de 90% al final de cada fase.

PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN



Gráfica 9 Evolución de la eliminación de 1-etoxi-2-propanol (RAFA)

En la gráfica 10, se observa como la adaptación en el reactor RALF, fue algo más lenta, pero alcanzo valores de degradación del sustrato de un 90% para 1-etoxi-2-propanol (E2P).



Gráfica 10 Evolución de la eliminación de 1-etoxi-2-propanol (RALF)

Esta observación final apoya los valores de eliminación de la carga orgánica total mostradas en las gráficas 7 y 8, que confirma que los reactores tuvieron al final una mejor adaptación a la carga orgánica para eficacias de eliminación del 100% para el etanol y acetato de etilo y un 90% para el 1-etoxi-2-propanol.

### 5.2.3. pH, Alcalinidad y Conductividad

A continuación, en la tabla 18 se presenta la media aritmética y la desviación del pH y la conductividad de los dos reactores con las medidas realizadas en el laboratorio procedentes del efluente, así como la media de la alcalinidad de los dos reactores.

Tabla 18 Media aritmética y desviación estándar del pH, Conductividad y Alcalinidad de los reactores

Parámetro	Reactor RAFA	Reactor RALF
pH	7,54±0,3	7,73±0,3
Conductividad (mS/cm)	6,13±0,6	6,10±0,6
Alcalinidad (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	2689,22	2735,08

Durante el tiempo de funcionamiento de los reactores no se produjeron cambios significativos en el pH ni en la conductividad. Los dos reactores se comportaron de la misma manera durante el tiempo de operación. Los dos reactores mostraron pH y conductividades entorno a 7,6 y 6,1 mS/cm hecho que indica que se produjeron idénticas condiciones ambientales. Para las condiciones adecuadas de las bacterias metanogénicas, el pH se mantuvo entre los 7 y 8, señal que indica condiciones adecuadas, pero podrían ser un poco básicas, ya que las metanogénicas funcionan mejor a pH de entre 6,4 y 7,8.

La alcalinidad se mantuvo en valores normales durante todo el periodo de funcionamiento de los reactores, dando valores de entre 2300 (mgCaCO<sub>3</sub>/L) y 3100 (mgCaCO<sub>3</sub>/L).

La concentración de ácidos marca el correcto funcionamiento de los reactores debido a que, si el reactor no acepta la carga orgánica, esta aumentara y puede comprometer el proceso de degradación, por esto hay que controlar la producción de ácidos grasos volátiles y la alcalinidad del interior de los reactores.

#### 5.2.4. Producción de Metano

En la producción de Metano en ambos reactores se midió durante las cuatro fases del ensayo.

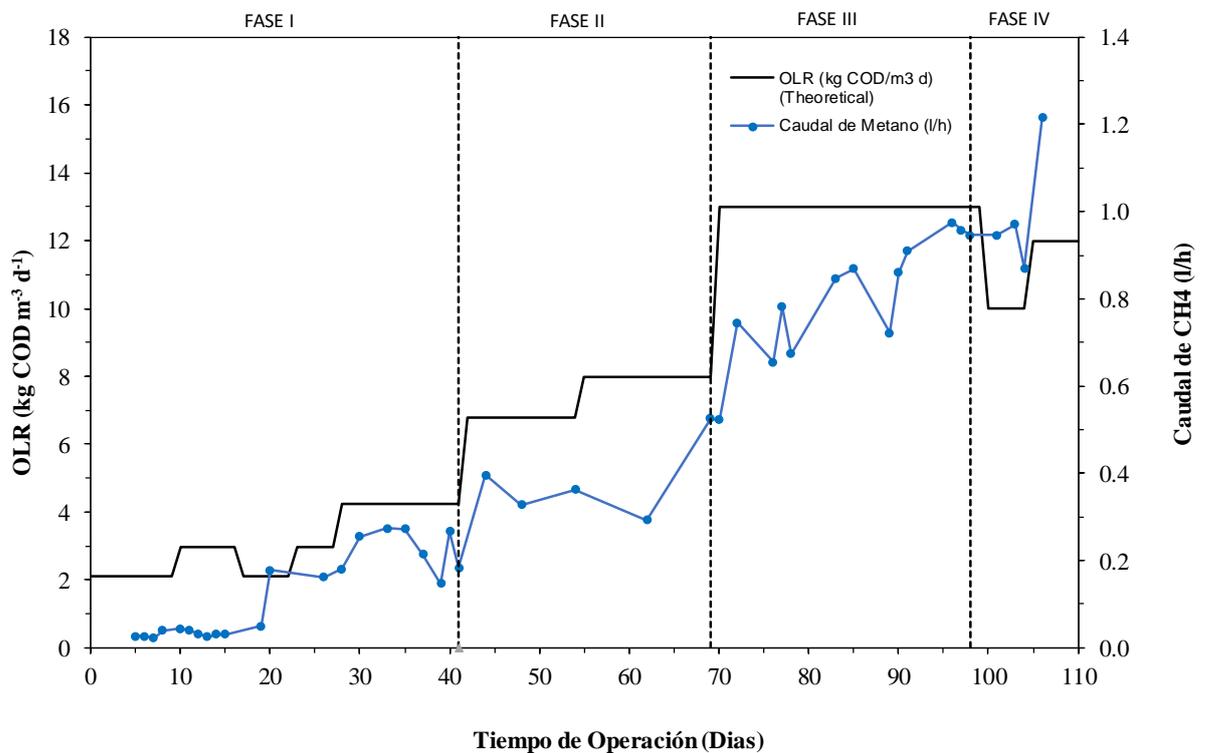
En la gráfica 11 se muestra el caudal de metano producida en el reactor RAFA, medido durante el proceso de funcionamiento. Se puede observar que, desde la primera fase de funcionamiento, el caudal de metano aumentaba progresivamente según aumentaba la carga orgánica. En los periodos de más carga se ve un aumento del caudal de metano y sobre todo en la última fase donde se suministró el sustrato en continuo, llegando el caudal de metano a 1,2 l/h con cargas orgánicas aplicadas de 12 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día).

Los 20 primeros días de la primera fase la producción de metano fue bastante baja debido a la adaptación de los microorganismos. A partir del día 21 la tendencia fue en aumento.

En la segunda fase de funcionamiento la tendencia fue en aumento a excepción del día 62.

En la tercera fase, con una carga orgánica aplicada mayor, la tendencia fue muy positiva.

En la cuarta fase, en continuo, es cuando se consiguieron caudales de metano de 1,2 l/h.

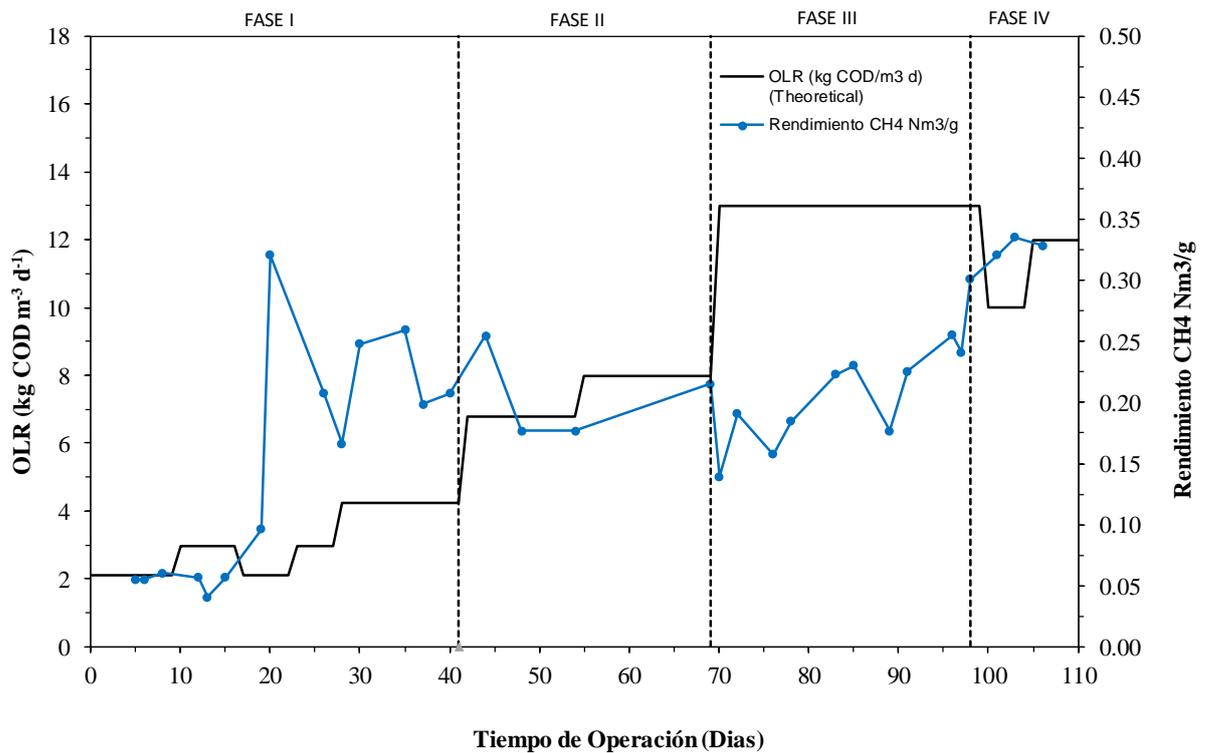


Gráfica 11 Caudal de metano durante el tiempo de funcionamiento del reactor RAFA

## PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN

En la gráfica 12, se muestra el rendimiento de metano en el reactor RAFA durante el tiempo de funcionamiento calculado a partir de los caudales de metano, la carga orgánica y la eficacia de eliminación de la carga orgánica.

Los valores de producción fueron muy variables, en el periodo inicial (primera fase) la media fue de  $0,04 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{g DQO}$  eliminada. En las dos siguientes fases (II y III) la media fue de  $0,20 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{g DQO}$  eliminada y, por último, en la última fase se consiguieron alcanzar valores de  $0,35 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{g DQO}$  eliminada.

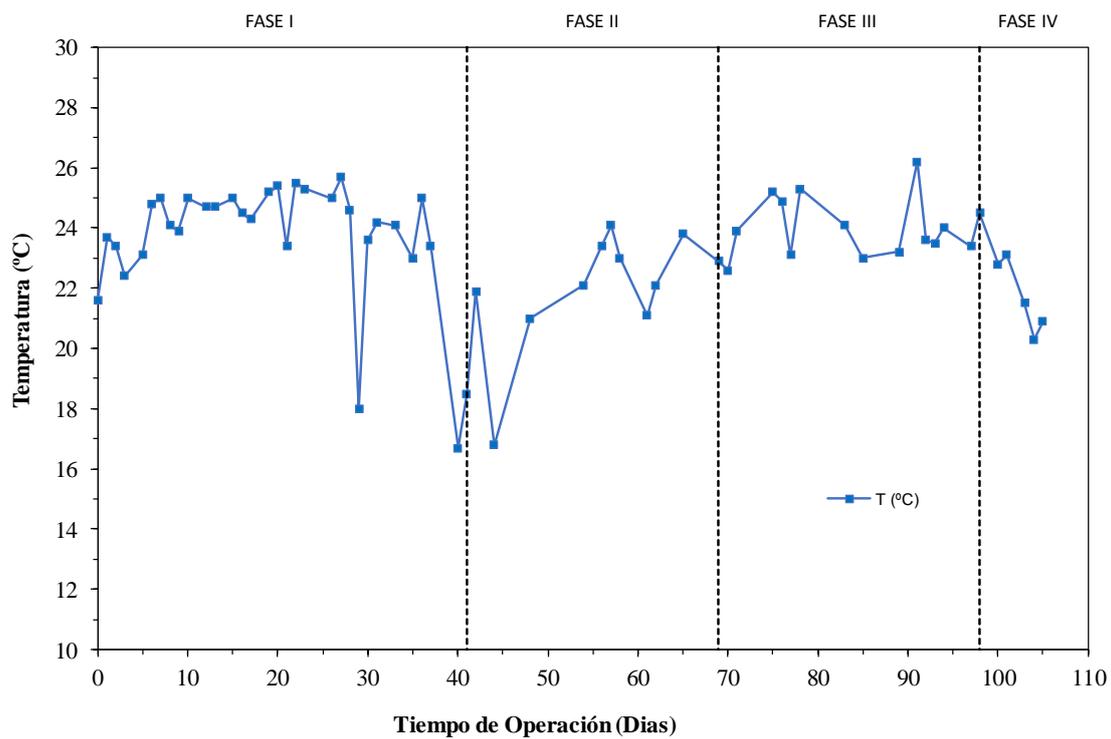


Grafica 12 Rendimiento de metano durante el tiempo de funcionamiento del reactor RAFA

(Lertsittichai, 2007) observó que en el reactor RAFA con Chitosán aumentaba la producción de biogás en un 35%.

En cuanto a la composición del biogás medido para el reactor RAFA, se tomaron muestras puntuales y se analizaron las concentraciones de metano, dióxido de carbono y ácido sulfhídrico. El porcentaje fue de 71% para  $\text{CH}_4$ ; 29% de  $\text{CO}_2$  y 400 ppm de  $\text{H}_2\text{S}$ .

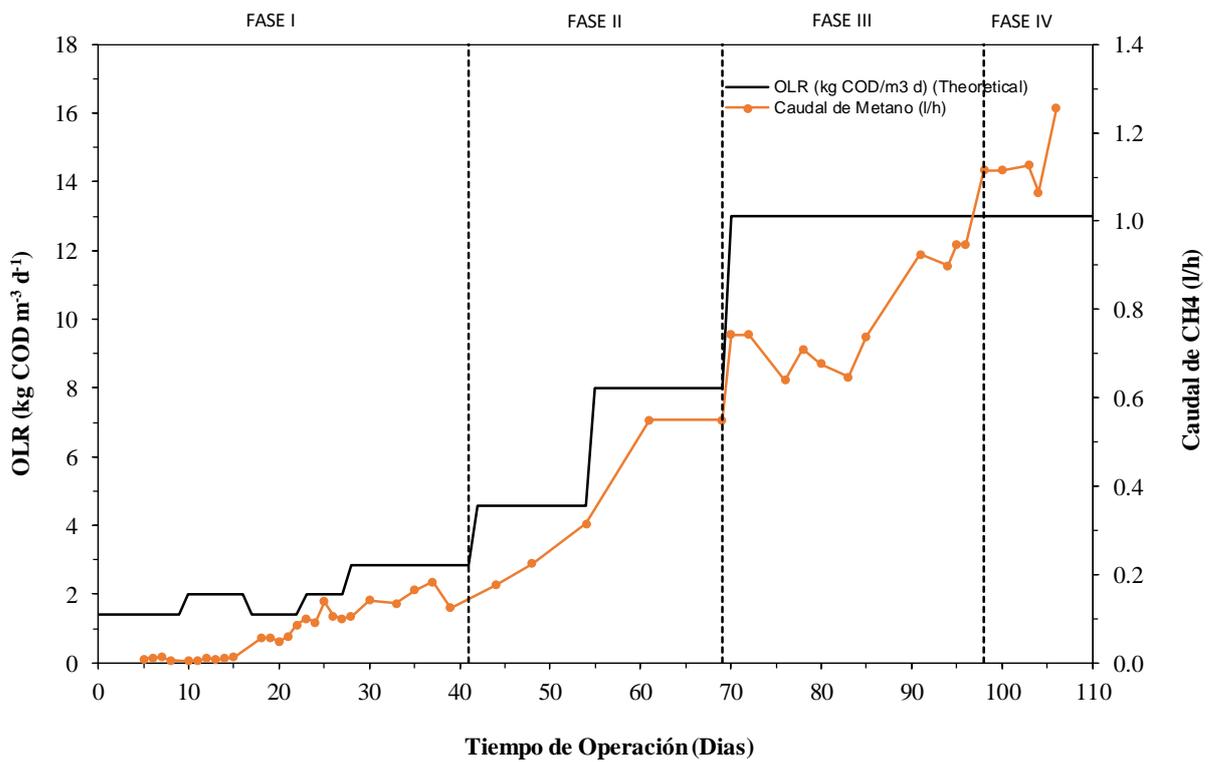
PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN



Grafica 13 Temperatura en el reactor RAFA

## PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN

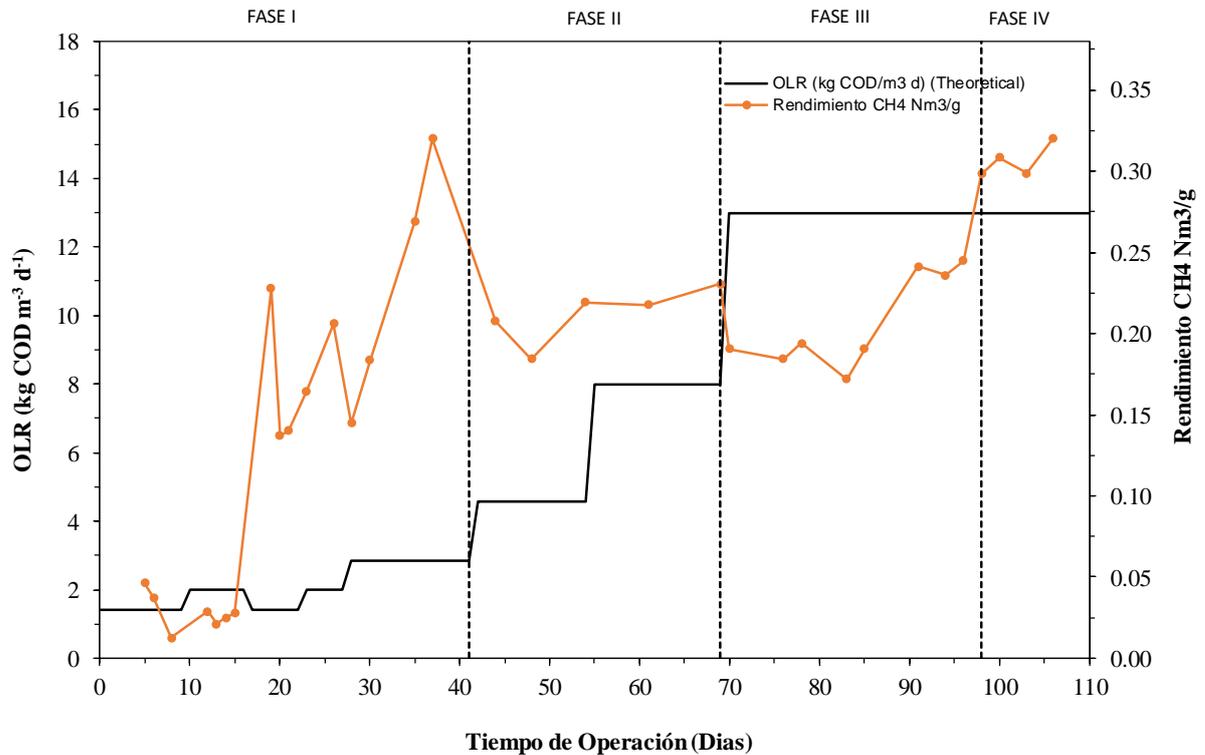
Para el reactor RALF, (gráfica 14) el caudal de metano medido durante el funcionamiento, el caudal de metano aumentaba progresivamente según aumentaba la carga orgánica. En los periodos de más carga, se ve un aumento del caudal de metano y sobre todo en la última fase donde se suministró el sustrato en continuo, llegando el caudal de metano a 1,3 l/h con cargas orgánicas aplicadas de 13 kg DQO/(m<sup>3</sup>-día).



Gráfica 14 Caudal de metano durante el tiempo de funcionamiento del reactor RALF

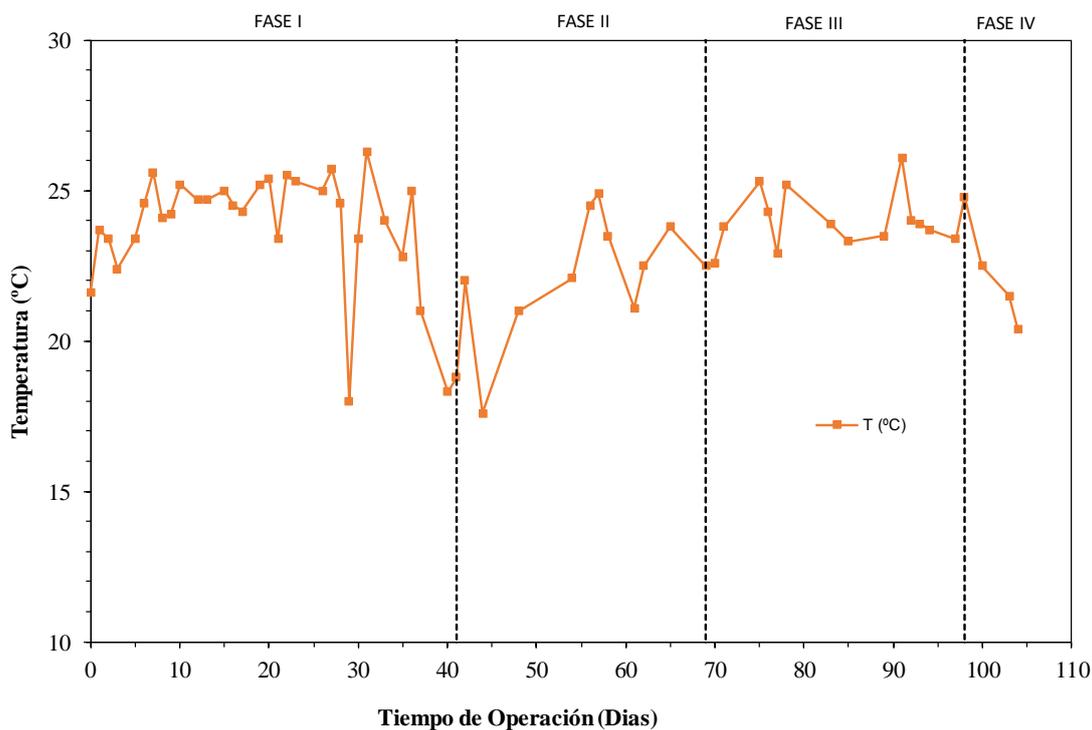
PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN

En la gráfica 15, se muestra el rendimiento de metano en el reactor RALF durante el tiempo de funcionamiento calculada a partir de los caudales de metano, la carga orgánica y la eficacia de eliminación de la carga orgánica. Los valores de producción fueron muy variables, pero consiguieron alcanzar valores de  $0,35 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{g DQO}$  eliminada.



Gráfica 15 Rendimiento de metano durante el tiempo de funcionamiento del reactor RALF

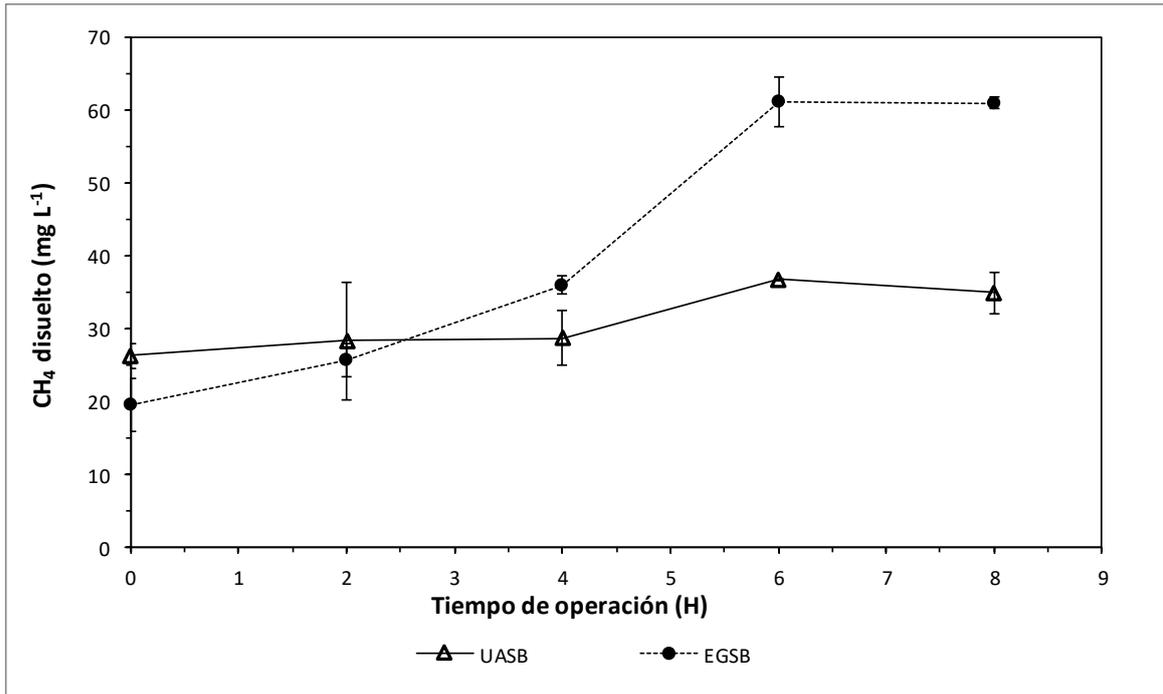
En la composición de biogás medido para el reactor RALF, se tomaron muestras puntuales y se analizaron las concentraciones de metano, dióxido de carbono y ácido sulfhídrico. El porcentaje de bigas fue de 71% para  $\text{CH}_4$ ; 29% de  $\text{CO}_2$  y 400 ppm de  $\text{H}_2\text{S}$ , igual para cada reactor.



Grafica 16 Temperatura en reactor RALF

Una observación significativa en la producción de metano indica que, el máximo estequiométrico a 25°C es de menor producción debida a la disolución de metano en el agua (grafica 17), que impide el paso de metano a la corriente de gas, ya que en días de funcionamiento el laboratorio donde se situaban los reactores estaba por debajo de la temperatura idónea (grafica 13 y 16). Esta cantidad de metano disuelto se realizó en un día cualquiera de funcionamiento de los reactores (día 94). La cantidad de metano disuelto aumentaba según pasaban las horas llegando a 35 mg CH<sub>4</sub>/l para el reactor RAFA y 60 mg CH<sub>4</sub>/l.

Otra observación significativa de la menor producción de metano fue el crecimiento de la biomasa celular en el interior del reactor, ya que el crecimiento celular disminuye el rendimiento de la producción de metano a partir de la degradación de los compuestos orgánicos, esto junto a la inyección de sustrato intermitente puede explicar el bajo rendimiento de metano en el reactor.

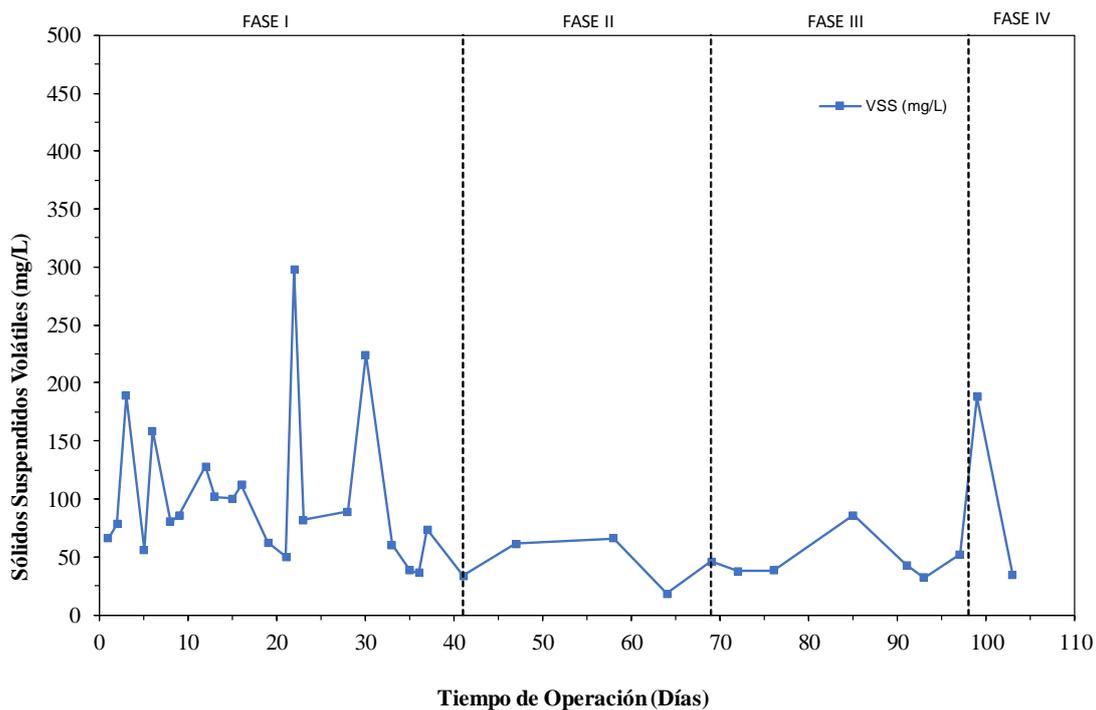


Grafica 17 Metano disuelto en los reactores RAFA y RALF en el día 94 de funcionamiento

### 5.2.5. Capacidad de retención del fango

Los sólidos suspendidos en los reactores operando con un fango granular se encuentran en mayores cantidades que en un fango sin granular, por lo que el avance de la granulación se puede observar cuando se produzca un aumento en la concentración de sólidos suspendidos. La materia volátil seguirá la misma tendencia en el caso de que se produzca la granulación y el aumento del tamaño de partícula del fango.

En la medida de la capacidad de retención del fango, se debe observar la concentración de los sólidos suspendidos en el efluente a lo largo del periodo de funcionamiento de los reactores. En las gráficas 25 y 26 se muestra la concentración de sólidos suspendidos en muestras obtenidas a la salida de los reactores y analizadas con el ensayo de determinación de la concentración de los sólidos visto en el apartado 3.4.9.

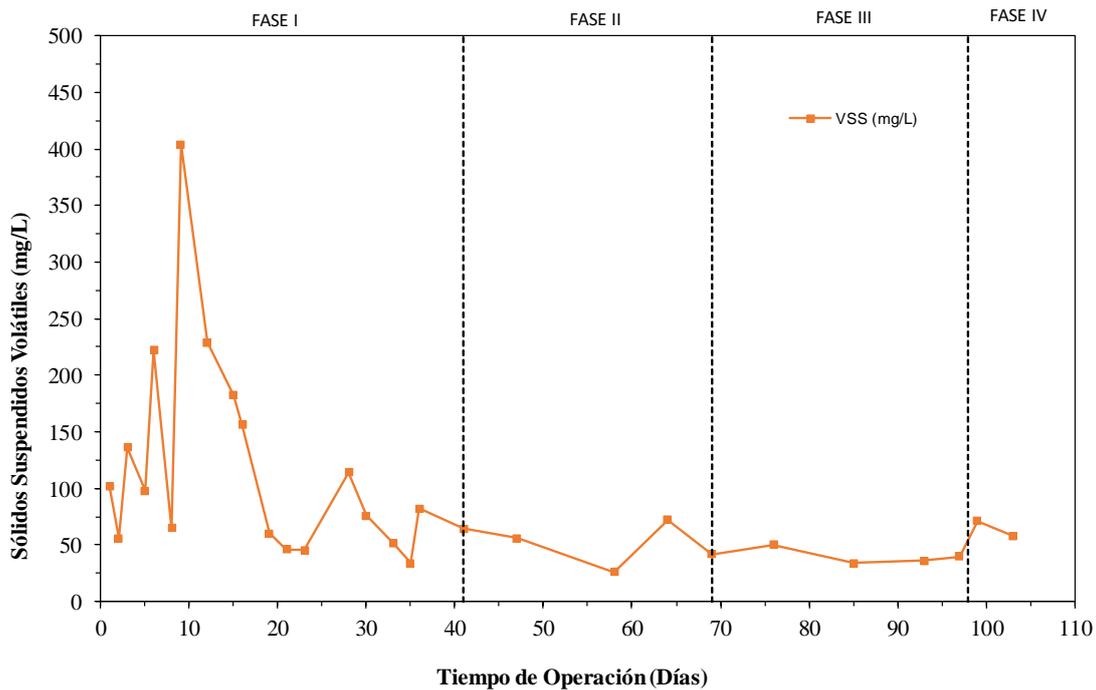


Grafica 18 Sólidos suspendidos volátiles del reactor RAFA

Se observa cómo en el reactor RAFA (Grafica 18) los primeros días, la concentración de sólidos en el efluente fue superior a los 100 mg/L mostrando baja retención del fango debido a que aún se estaban agregando las partículas del fango debida a la adición del Chitosán. En el día 21, el reactor sufrió, como se contará en el punto 5.3.1., problemas de flotación debido a la adhesión de la biomasa a las burbujas de biogás, que conllevó al taponamiento del separador gas, líquido y sólido (GLS).

A partir de la segunda fase la tendencia es ligeramente descendiente, lo que da una idea de la retención del fango en el reactor.

Cuando se incrementó la carga de sustrato orgánico en la última fase, se observa un aumento puntual de los sólidos suspendidos en el efluente, como consecuencia el levantamiento del fango que se recuperó en la siguiente medida.



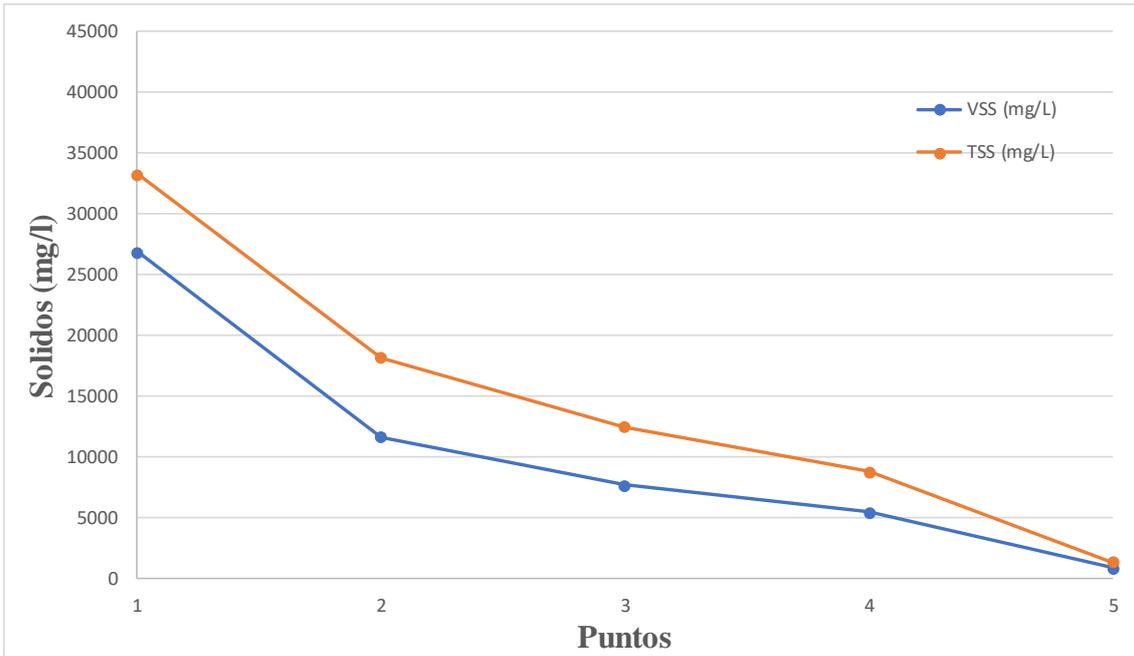
Grafica 19 Sólidos suspendidos volátiles del reactor RALF

En el reactor RALF (Grafica 19), los primeros días de funcionamiento tuvieron los mismos problemas que en el reactor RAFA, pero se observa que una tendencia es decreciente en la concentración de sólidos suspendidos en el efluente.

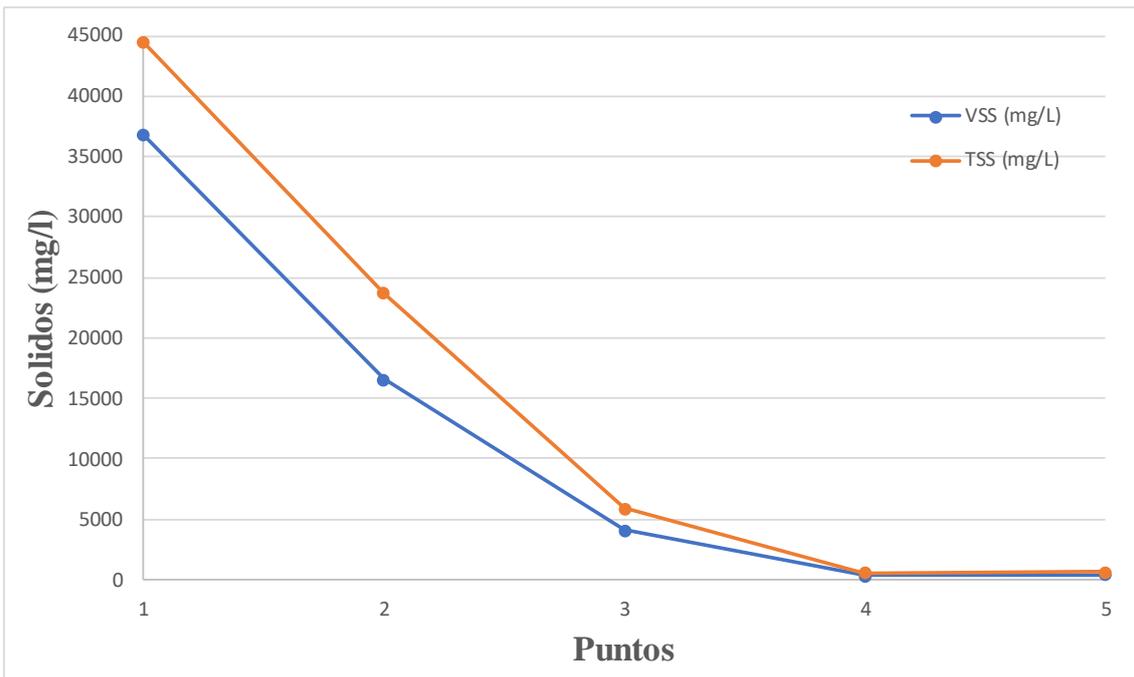
A continuación, las gráficas 20 y 21 que muestra el contenido de sólidos suspendidos y sólidos suspendidos volátiles de los reactores en un día cualquiera, este día corresponde al día 82 de funcionamiento, y muestra que el punto 1 es el punto más bajo en la entrada (Afluente) y el punto numero 5 es la salida (efluente) con el resto de los puntos a mitad del reactor.

Se observa como los dos reactores concentran todos sus sólidos en la parte inferior, por lo que se puede concluir la buena retención del fango dentro de estos reactores.

PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN



Grafica 20 Evolución de los sólidos dentro del reactor RAFA en el día 82



Grafica 21 Evolución de los sólidos dentro del reactor RALF en el día 82

### 5.3. Adición del Chitosán en el proceso de granulación

En la observación del proceso de granulación mediante la adición del Chitosán de los dos reactores, se realizó un muestreo periódico del fango contenido en ambos reactores. Se tomaron muestras de fango cada tres semanas, concretamente los días 21, 42, 61, 82 y 97 de funcionamiento para realizar el ensayo de distribución de tamaño de partícula.

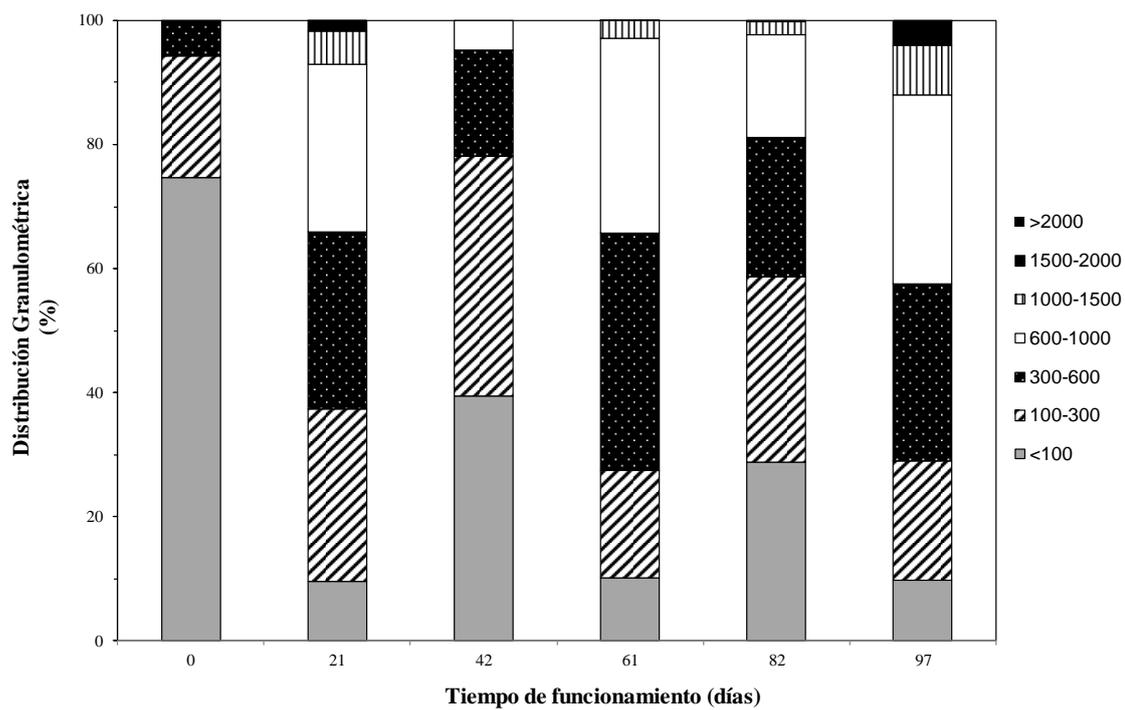
También se tomaron muestras del efluente de los reactores para la observación del agua y la evaluación de los sólidos suspendidos.

#### 5.3.1. Evolución del tamaño de partícula del fango

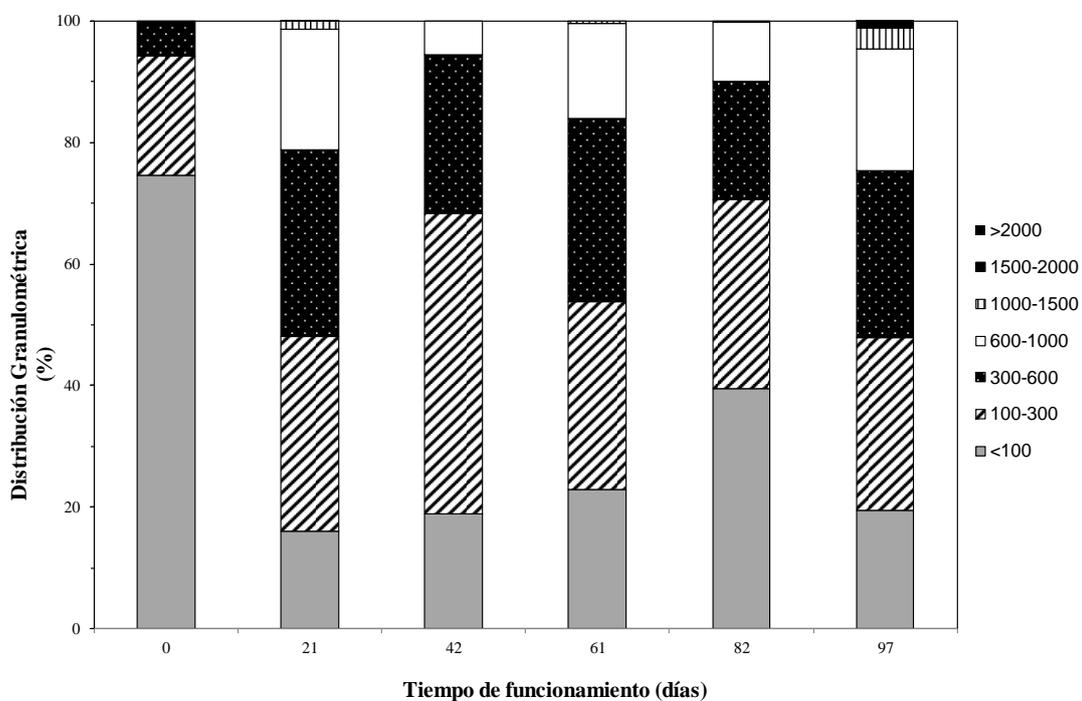
La evolución de la distribución del tamaño de partícula de las muestras de fango es el primer parámetro indicador de la evolución del tamaño de partícula dentro del reactor. Para su evaluación, se analizó este parámetro en todas las muestras de fango obtenidas los días 21, 42, 61, 82 y 97 de funcionamiento de los reactores.

A continuación, en las gráficas 22 y 23 para el reactor RAFA y RALF respectivamente, se presenta la distribución de tamaños entre 100 y 2000 $\mu\text{m}$  agregados en <100, 100-300, 300-600, 600-1000, 1000-1500, 1500-2000, >2000.

PUESTA EN MARCHA DE REACTORES ANAEROBIOS CON ALIMENTACIÓN INTERMITENTE DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN PRESENCIA DE CHITOSÁN

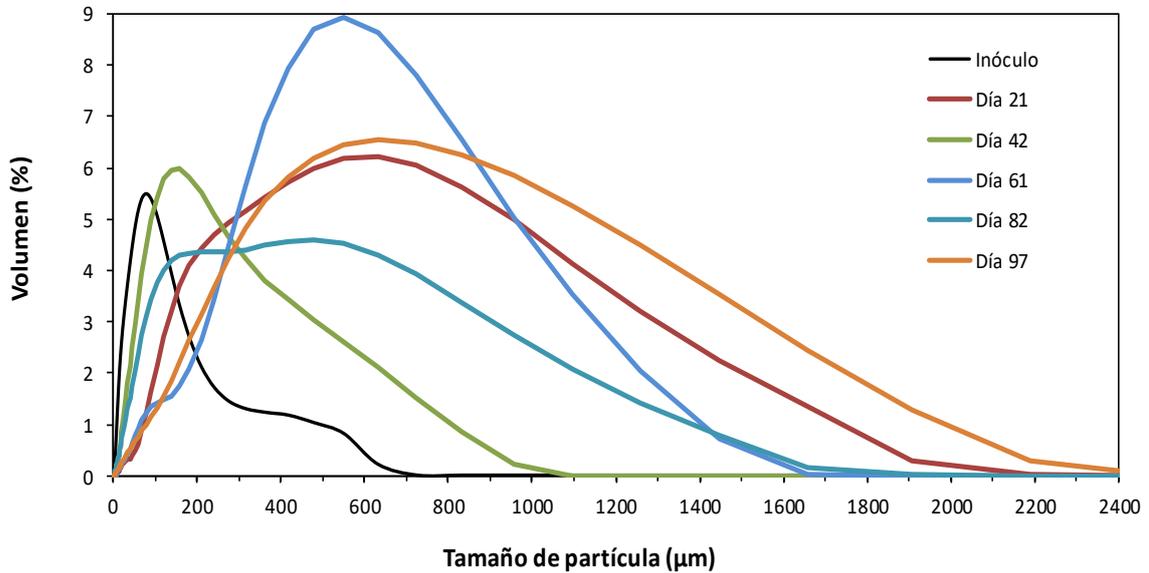


Grafica 22 Evolución de la distribución del tamaño de partícula durante el tiempo de funcionamiento del reactor RAFA

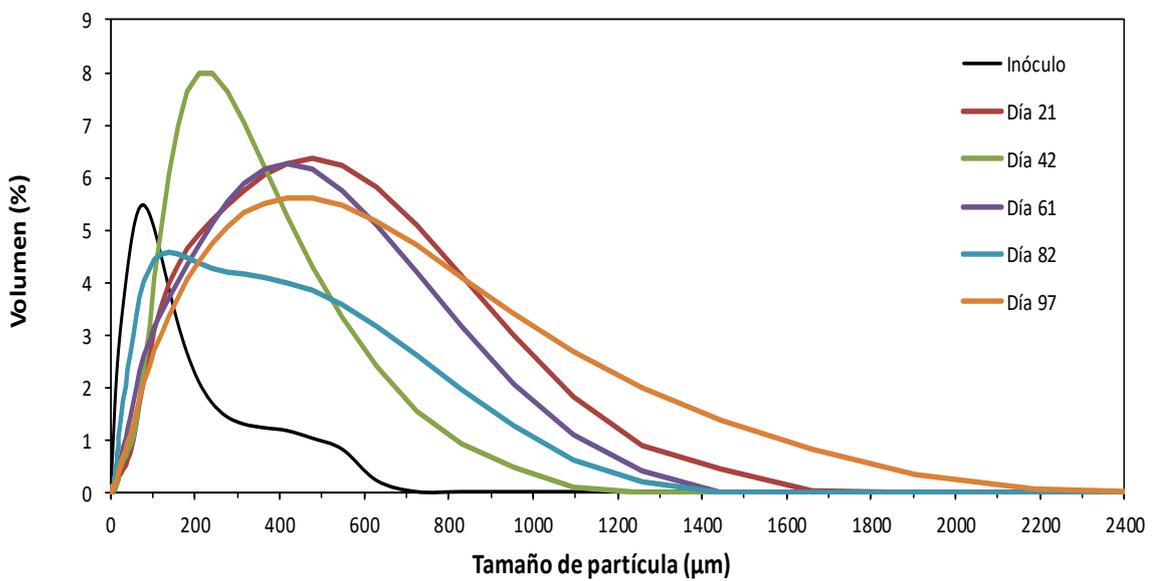


Grafica 23 Evolución de la distribución del tamaño de partícula durante el tiempo de funcionamiento del reactor RALF

En los gráficos siguientes observamos la distribución del tamaño de partícula de todas las muestras de los dos reactores.



Grafica 24 Distribución del tamaño de partícula del reactor RAFA



Grafica 25 Destrucción del tamaño de partícula del reactor RALF

Las muestras del día 0 se corresponden con el fango antes de su introducción en los reactores, por lo que no hay diferencia con los datos del fango inicial en ambos reactores.

En el análisis de la evolución se observa que en el día 21 del reactor RAFA, el tamaño de partícula de más de 300  $\mu\text{m}$  era algo mayor que el reactor RALF, aproximadamente un 10% mayor. El tamaño de partícula del reactor RAFA de más de 300  $\mu\text{m}$  fue de 62,63% y el reactor RALF es de 51,9%.

En la tercera adición del Chitosán, a partir del día 21 hasta el día 42 se observaron problemas de flotación de la biomasa (Ilustración 19), debido a la adhesión de la biomasa a las burbujas de biogás, que conllevó al taponamiento del separador gas, líquido y sólido (GLS). Este problema sucedió en los dos reactores por igual taponándose prácticamente a la vez, dando como resultado la reducción brusca del porcentaje de partículas mayores de 300 $\mu\text{m}$  que pasó a ser de 21,8% y 31,6% en los reactores RAFA y RALF, respectivamente. A la vista de los resultados se dejó de adicionar Chitosán durante dos semanas y no cada semana como se venía haciendo por una posible sobredosificación.

En el día 61 estos problemas desaparecieron dando nuevamente altos resultados de granulación de las partículas en el reactor RAFA de un 72,4% de tamaño de partícula mayor de 300  $\mu\text{m}$  y un 46,3% en el reactor RALF.

En el día 82 se observa un incremento de las partículas pequeñas (<300 $\mu\text{m}$ ) en ambos reactores y particularmente en el reactor RALF, los tamaños máximos del reactor RALF fueron de 1500  $\mu\text{m}$ , pero en un porcentaje muy bajo y para el reactor RAFA fue de algo mayor.

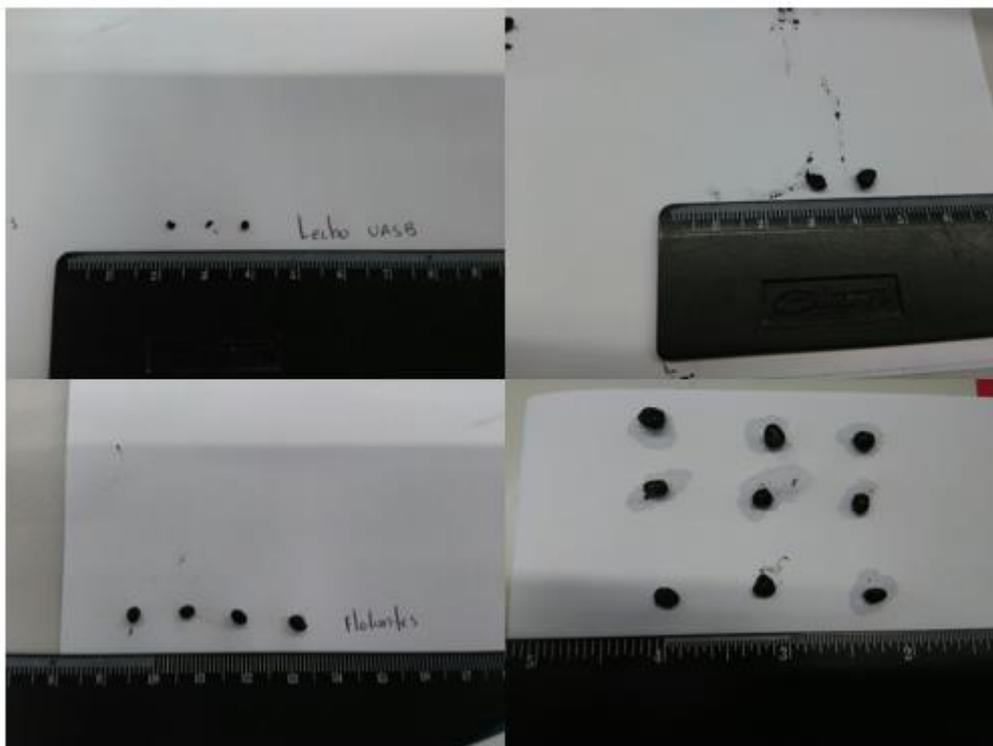
En la última muestra, tomada el día 97, se aprecia en ambos reactores, un aumento considerable del tamaño de las partículas, como consecuencia de la fluidización del lecho y ascenso de las partículas de la parte baja del reactor.

Tabla 19 Diámetro medio y porcentaje de partículas mayores a 300  $\mu\text{m}$

Día	RAFA	RALF	RAFA	RALF
	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )		% > 300 $\mu\text{m}$	
0	85,3	85,3	5,7	5,7
21	474,8	353,6	62,6	51,9
42	186,8	238,1	21,8	31,6
61	464,9	307,2	72,4	46,3
82	312,0	224,2	41,4	29,5
97	562,1	385,8	71,1	52,2

En estos reactores se consiguieron tamaños de partícula con un diámetro de unos 2 mm, hecho que constata con los tamaños de partícula encontrados en la bibliografía. Según Liu y Tay (2004) el tamaño medio de los fangos granulares suele tener estar entre 1 y 2 mm. Los tamaños obtenidos en este estudio están adecuados a estos tamaños medios.

En la ilustración 19 se observa los gránulos dentro de los reactores en el día 42 de funcionamiento, las fotos de la izquierda pertenecen al reactor RAFA y las fotos de la derecha al reactor RALF, las fotos en la parte superior son del lecho de los reactores y la parte inferior son los gránulos flotantes.



*Ilustración 19 Fotos de los gránulos dentro de los reactores en el día 42 (arriba: Lecho; Abajo: Flotantes; Izquierda: Reactor RAFA; Derecha: Reactor RALF)*

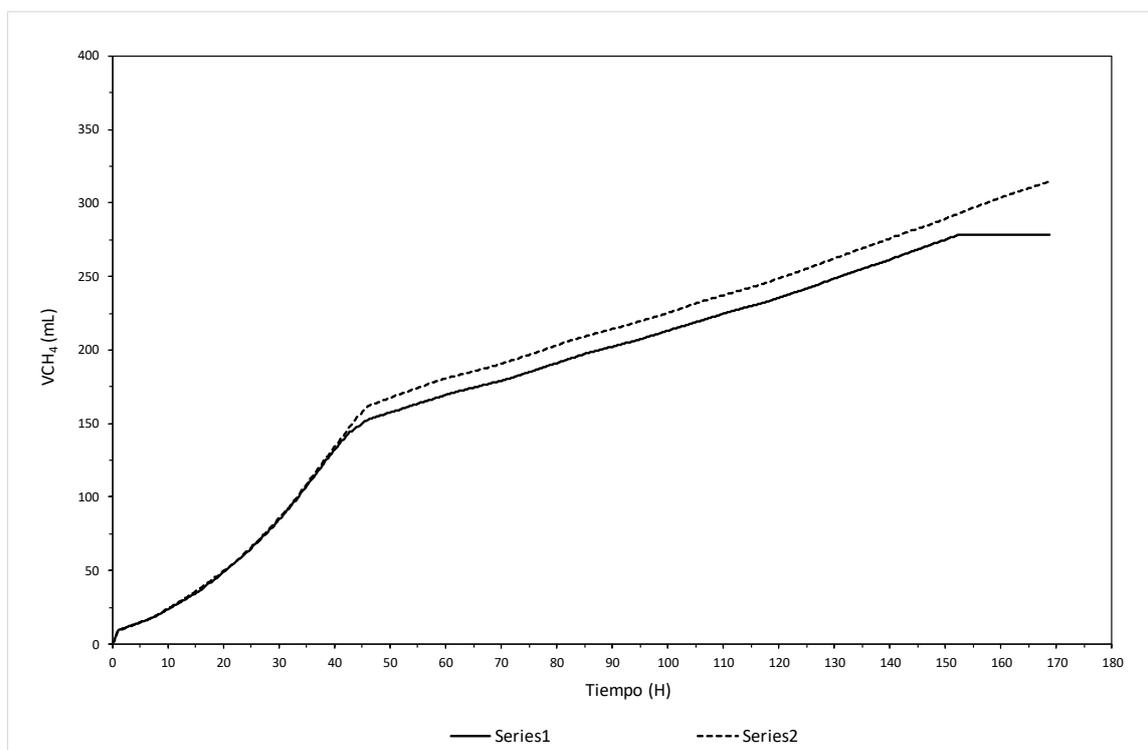
La evolución del tamaño de partícula está en relación con el proceso de crecimiento de los gránulos descritos por Li y Yu (2011) y Yan y Tay (1997). El tamaño de las partículas aumentó lentamente hasta alcanzar los gránulos de cierta entereza en las primeras semanas de funcionamiento, momento en el que su crecimiento se hizo de forma rápida a excepción de problemas de flotación de la biomasa, hasta el día 97, en los que los gránulos alcanzaron la estabilidad y se mantuvieron con ese tamaño hasta el fin del ensayo.

Se puede concluir que se produjo un crecimiento de las partículas en ambos reactores. Esto sugiere que el Chitosán evitó la disgregación de las partículas pequeñas y permitió el mantenimiento de las uniones establecidas en ellas, a excepción del problema del día 21 hasta el 42 por una posible sobredosificación.

#### 5.4. Actividad Metanogénica Específica (AME)

En el inicio del experimento y antes de poner en marcha los reactores, se hizo el ensayo de la actividad metanogénica específica del fango inóculo con la finalidad de comparar esta actividad metanogénica inicial del fango con la actividad metanogénica desarrollada tras el periodo de funcionamiento de los reactores a escala de laboratorio. En este ensayo se utilizaron dos reactores de 400 ml mediante el equipo descrito en el apartado 3.4.11. con un alimento sintético con una mezcla de disolventes de 3,5:1:0,5 en masa de Etanol, Acetato de Etilo y 1-Etoxy-2-Propanol respectivamente con la concentración de 2,5 g DQO/L y con la concentración de nutrientes descrita en el apartado 3.3.

En la gráfica 26 se representa el volumen de metano producido frente al tiempo que han mostrado los dos replicas. El ensayo se realizó por duplicado.



Gráfica 26 Actividad metanogénica antes de inocularse en los reactores

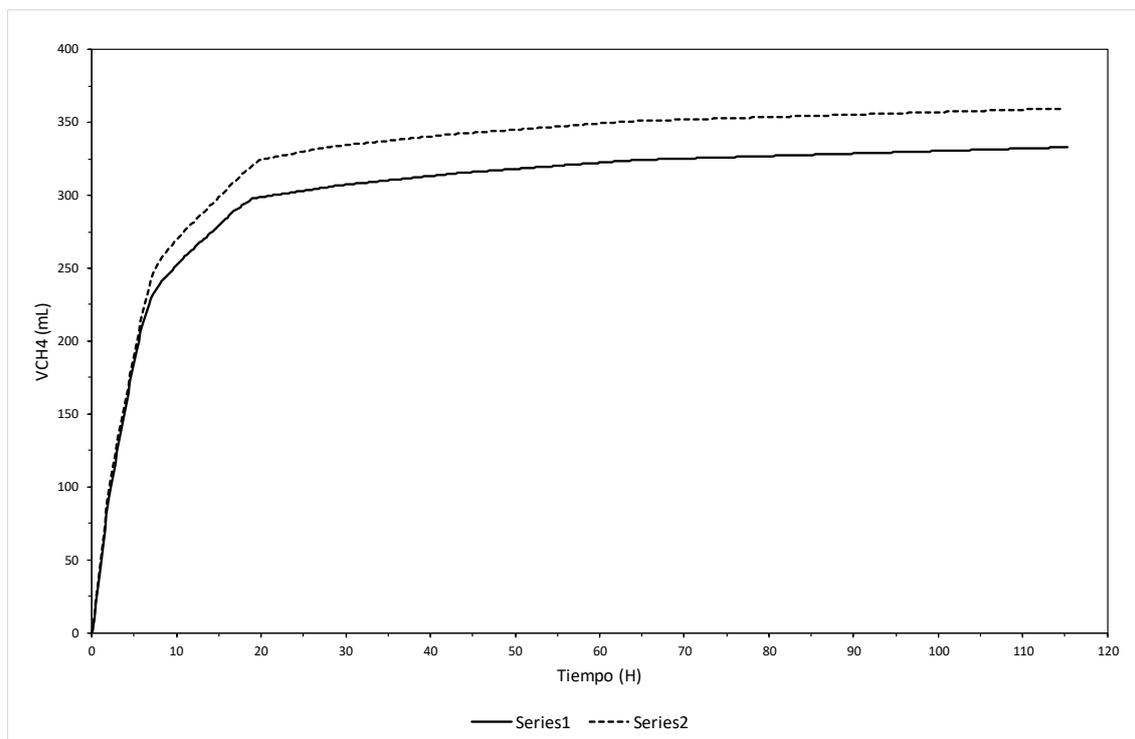
La producción de metano creció en los dos replicas por igual hasta alcanzar los 150 ml, con lo que indica que no existió una fase de retardo y adaptación al sustrato por parte de los microorganismos, ya que estos iniciaron la actividad de degradación rápidamente. Tras este periodo la producción fue creciendo de manera más paulatina hasta alcanzar los 275 ml a las 150 horas de funcionamiento donde dejó de aumentar y se mantuvo en el tiempo apareciendo

pequeñas diferencias en el volumen de metano residual, no así en la pendiente de la curva inicial.

Estos cambios indican los periodos de degradación del sustrato orgánico debido a que en la fase de mayor producción de metano se debe a la degradación del etanol, y posteriormente a la degradación del acetato de etilo y el 1-etoxi-2-propanol con una menor velocidad de degradación. Ante esta producción sin pausa de metano se puede concluir que pudo existir una pequeña adaptación por parte de los microorganismos para la degradación del acetato de etilo y el 1-etoxi-2-propanol. A partir de las 160 horas de funcionamiento ya no se produjo metano debido a que no quedaba sustrato por degradar.

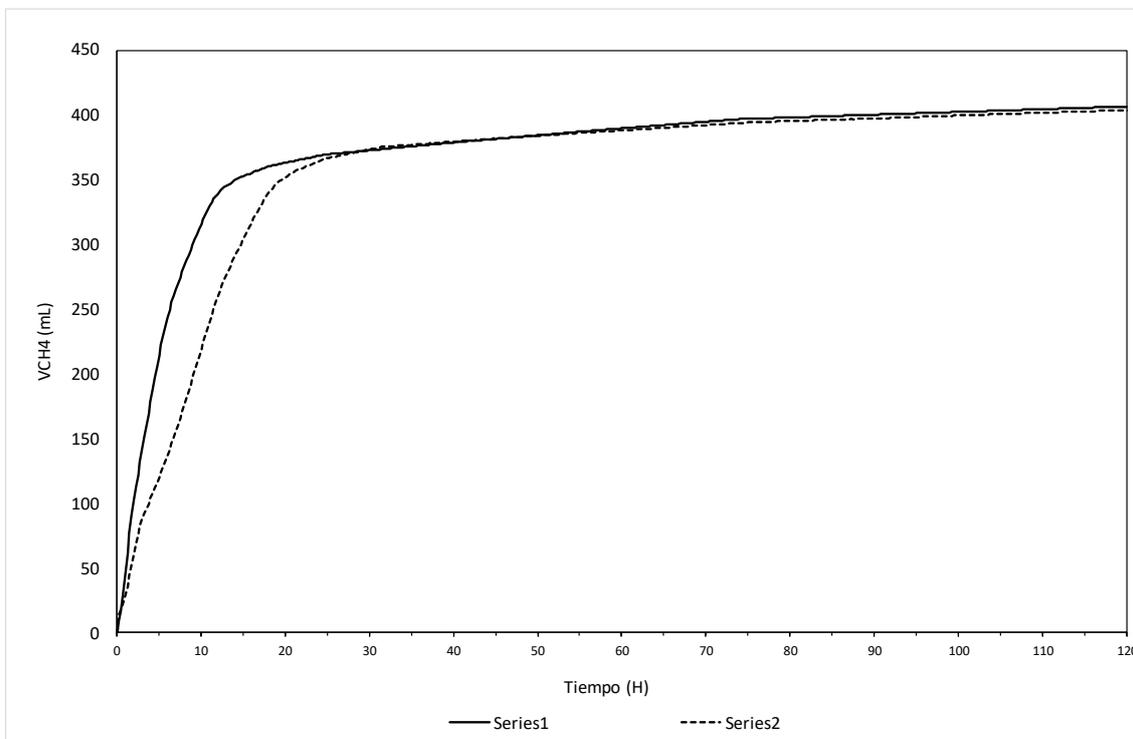
Una vez finalizada la operación de los reactores RAFA y RALF, se hizo otro ensayo de la actividad metanogénica específica con la finalidad de comparar la actividad metanogénica final del fango. En este ensayo se utilizaron dos reactores de 400 ml, igual que en el primer ensayo.

En la gráfica 27 se muestran las curvas del volumen de metano producido por el reactor RAFA que contenía una mezcla de sustrato, ya que los blancos no producían metano en ningún caso. Como se observa, las dos muestras tuvieron un comportamiento idéntico entre si hasta llegar a las 20 horas de funcionamiento, donde la pendiente parece idéntica en las dos muestras analizadas con la mezcla de sustrato.



Grafica 27 Actividad metanogénica tras el funcionamiento del reactor RAFA

En la gráfica 28, se muestra también las curvas del volumen de metano producido por el reactor RALF que contenía una mezcla de sustrato idéntica al reactor RAFA. Las dos muestras tuvieron un comportamiento idéntico después de llegar a las 20 horas de funcionamiento.



Gráfica 28 Actividad metanogénica tras el funcionamiento del reactor RALF

Como se observan en la gráfica 27 y 28 ambos reactores se comportaron de una forma idéntica. La pendiente son muy parecidas en las dos graficas por lo que no se produjo una diferencia en la velocidad de producción del metano.

Si se comparan estas curvas de producción (graficas 27 y 28) con las desarrollada en la gráfica 26, se observa el mismo comportamiento, no existió fase de retardo inicial, ni periodo de adaptación por parte de los microorganismos para la degradación del sustrato orgánico. La diferencia entre antes de ser introducidas en el reactor y después escriba en el volumen total y en la pendiente inicial.

Por una parte, la degradación principal del sustrato y principal producción de metano se produce en tan solo 20 horas mientras que, en la anteriores (grafica 26), se produce a las 45 horas de funcionamiento. Esto implica que la biomasa granular obtenida en los reactores RAFA y RALF tras 120 días de operación fue capaz de degradar el sustrato más rápidamente.

Por otro lado, tras el periodo de máxima producción, se observa un periodo de producción de metano más lenta. Este periodo de emisión de metano final parece indicar la liberación de

metano retenido en los gránulos que han sido desarrollados durante el funcionamiento de los reactores.

El volumen de metano producido en los reactores fue de 350 Nml para el reactor RAFA y de 400 Nml para el reactor RALF.

La actividad metanogénica específica ha aumentado en los dos reactores respecto al fango inicial, siendo el aumento mayor en el reactor RALF con recirculación.

Concluimos que el fango con mayor actividad metanogénica fue la del reactor RALF, según (Liu & Tay, State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnology Advances, 2004) una mayor actividad metanogénica es indicador de una buena granulación del fango, por lo que se puede decir que, el fango de los reactores con Chitosán, sufre un proceso de granulación que permite el desarrollo de una mayor densidad de biomasa en sus partículas.

## 6. Conclusiones

Como objetivo de esta investigación se planteó evaluar la formación de biomasa granular en los dos reactores anaerobios alimentados con disolventes orgánicos de manera intermitente, con la adición del polímero Chitosán, para la posterior eliminación de estos sustratos como el etanol, acetato de etilo y el 1-etoxi-2-propanol y comprobar la actividad metanogénica del fango.

En estos reactores con adición del polímero, demostró un aumento del tamaño de las partículas de la biomasa, eliminando así, la carga orgánica y el sustrato orgánico con una concentración óptima de 8 mg Chitosán/gSSV. Esta concentración resultaba ser la concentración mínima que ofrecía mayores tamaños de partícula realizados con el ensayo del Jar-Test. Se concluye que disminuía así la turbidez, sedimentaba el fango y permitía la formación de flóculos en dicho ensayo.

En la puesta en marcha de los reactores RAFA y RALF inoculados con fango de la planta de Quart Benager, con su concentración óptima de Chitosán, alimentados con una carga orgánica contaminada con mezcla de sustrato orgánico, se observó el tamaño de partícula, donde en el inóculo, el porcentaje de más de 300  $\mu\text{m}$  era de 5,72% y al final de la investigación se consiguieron tamaños de partícula mayores a 300  $\mu\text{m}$  de 71,1% y 52,2% para RAFA y RALF respectivamente.

También, la concentración de sólidos en el interior de los reactores, al final se mantuvo constante con una concentración de aproximadamente 30 gSS/l para el reactor RAFA y de 40 gSS/l en el reactor RALF, con lo que concluimos, con los datos obtenidos, que el polímero Chitosán puede permitir la retención de la biomasa dentro del reactor y también puede permitir el crecimiento del tamaño de las partículas por la agregación de estas. También puede reducir el periodo de granulación necesario para su formación ya que puede evitar la disgregación de esta.

La eliminación de la carga orgánica, los dos reactores mostraron eficiencias de eliminación de más de 90%. Para la eliminación del etanol y acetato de etilo, su eliminación fue completa, y para el 1-etoxi-2-propanol su eliminación fue del 90%, con cargas orgánicas de 12 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día) para el reactor RAFA y 13 kg DQO/(m<sup>3</sup>·día) para el reactor RALF, llegando a alcanzar concentraciones de 2859,24 mg/l, 816,93 mg/l y 408 mg/l para etanol, acetato de etilo y 1-etoxi-2-propanol respectivamente (3,5:1:0,5 en masa).

Para la producción de metano, la observación significativa indica que el máximo estequiométrico a 25°C es de menor producción debida a la disolución de metano en el agua, que impide el paso de metano a la corriente de gas, ya que en días de funcionamiento el laboratorio donde se situaban los reactores estaba por debajo de la temperatura idónea. La cantidad de metano disuelto aumentaba según pasaban las horas llegando a 35 mg CH<sub>4</sub>/l.

Otra observación significativa de la menor producción de metano fue el crecimiento de la biomasa celular en el interior del reactor, ya que el crecimiento celular disminuye el rendimiento de la producción de metano a partir de la degradación de los compuestos orgánicos, esto junto

a la inyección de sustrato intermitente puede explicar el bajo rendimiento de metano en el reactor.

En cuanto a la calidad del efluente durante los 110 días de funcionamiento de los reactores utilizando este polímero llamado Chitosán, este no producía ninguna mejora de la calidad del efluente en cuanto a la turbidez y concentración de sólidos, por lo que a título personal requiere de un tratamiento posterior como por ejemplo reactores de microalgas para una mejora de la calidad del efluente.

## 7. Bibliografía

- Ahn, Y., Song, Y., Lee, Y., & Park, S. (2002). Physicochemical. *Environ. Technol.*
- Bermúdez, R. C., Rodríguez, S., Martínez, M. d., & Terry, A. (2011). Ventajas del empleo de reactores UASB en el tratamiento de residuales líquidos para la obtención de biogás.
- Bhunja, P., & Ghangrekar, M. (2006). Enhanced granulation by natural ionic polymer additives in UASB reactor treating low-strength wastewater. *Water Res.*
- Cano Myllymäki, E. J. (2018). *BeniSegway*. Obtenido de Costa Blanca Tour services: <http://costablancatour.com/>
- 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 Research*, 3434-3470.
- El-Mamouni, R., Leduc, R., & Guiot, S. R. (1998). Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Sci. Technol. Water Science and Technology*, 38(8-9 -9 pt 7), 341-347.
- Ferrer Polo, J., & Seco Torrecillas, A. (2007). *Tratamientos biológicos de aguas residuales (Second)*. Valencia: Universidad Politecnica de Valencia.
- Gagliano, M. C., Ismail, S. B., Stams, A., Plugge, C. M., Temmink, H., & Van Lier, J. B. (2017). *Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity*. *Water Res.*
- Gen, j., Int., A. v., & Van Leeuwenhoek, A. (2008). *Methanosarcina as the dominant acetoclastic methanogens during mesophilic anaerobic digestion of putrescible waste*.
- Grady, C. P., Daigger, G. T., & Lim, H. C. (1999). *Biological wastewater treatment (Second)* New York.
- Grady, C. P., Daigger, G. T., Love, N. G., & Filipe, C. D. (2011). *Biological wastewater treatment*. IWA Publishing. Obtenido de <http://www.cabdirect.org/abstracts/20113241295.html;jsessionid=63724182045FAAA C04390E5B5E6B708A>
- Hudayah, N., Suraraksa, B., & Chaiprasert, P. (2016). *Synergistic effects of the chitosan addition and polysaccharides-EPS on the formation of anaerobic granules*. *Environ. Technol.*
- Hulshoff Pol, L. W., de Castro Lopes, S. I., Lettinga, G., & Lens, P. N. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, 1376-1389.
- Hulshoff Pol, L. W., De Castro Lopes, S. I., Lettinga, G., & Lens, P. N. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, 1376-1389.
- Kalyuzhnyi S. V, I, S. V., A, D. M., N, P. S., V, S. M., A, K. N., & N, N. A. (1996). Organic removal and microbiological features of UASB-reactor under various organic loading rates. *Bioresource Technol.*

- Lafita, C., San-Valero, P., Marzal, P., Peña-roja, J., & Gabaldón, G. (2017). Enhancement of biomass retention in an EGSB reactor used to treat 1-methoxy-2-propanol. *SCI*.
- Lemos, C. (2007). Biological Wastewater Treatment Series. Anaerobic Reactors. *IWA*.
- Lertsittichai, S. L. (2007). *Improvement of upflow anaerobic sludge bed performance using chitosan. Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation*.
- Li, W. W., & Yu, H. Q. (2011). Physicochemical characteristics of anaerobic H<sub>2</sub>-producing granular sludge. *Bioresource technology*, 8653-8660.
- Lier, J. B., Mahmoud, N., & Zeeman, G. (2008). Anaerobic Wastewater Treatment.
- Lier, J. V., Zee, F. v., Frijters, C., & Ersahin, M. (2015). Celebrating 40 years anaerobic sludge bed reactors.
- Lim, S. J. (2014). Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment processes. *Biomass and Bioenergy*. *Biomass and Bioenergy*, 189-202.
- Liu, Y., & Tay, J. H. (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*. *Biotechnology Advances*, 1523-1534.
- Liu, Y., Xu, Lou, H., Yang, S. F., & Tay, J. H. (2003). Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research*.
- Lu, X. Z. (2017). *Sulfidogenesis process to strengthen re-granulation for biodegradation of methanolic wastewater and microorganisms evolution in an UASB reactor*. *Water Res.*
- Nicolella, C. v. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*. *Journal of Biotechnology*, 1 - 33.
- O'Reilly, J. L. (2010). *Microbial community dynamics associated with biomass granulation in low-temperature (15 oC) anaerobic wastewater treatment bioreactors*. *Bioresour. Technol.*
- Ramakrishnan, A. G. (2006). Anaerobic biogranulation in a hybrid reactor. *En J. H. Mater.*
- Ran Yang, H. L. (2016). A review on chitosan-based flocculants and their applications in water. *Water Research*.
- Schink, B., & Friedrich, M. (1994). Energetics of syntrophic fatty acid oxidation.
- Seghezze et al. (1998).
- Seghezze, L., Zeeman, G., Liel, J. B., Hamelers, H. V., & y Lettinga, G. (1998). The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*. *Bioresource Technology*, 175-190.
- Show, K. W. (2004). *Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors*. *Water Res.*

- Subramanyam, R. (2013). Physicochemical and Morphological Characteristics of Granular Sludge in Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors. *ENVIRONMENTAL ENGINEERING SCIENCE*.
- Thanh, N. W. (2016). *Impact of aluminum chloride on process performance and microbial community structure of granular sludge in an upflow anaerobic sludge blanket reactor for natural*. Water Sci. Technol.
- Torres, K., Alvarez-Hornos, F., San-Valero, P., Gabaldon, C., & Marzal, P. (2017). Granulation and microbial community dynamics in the chitosan-supplemented anaerobic treatment of wastewater polluted with organic solvents. *Water Research*.
- Van Der Berg, L. (1986). Anaerobic Digestion of Wastes, Division of Biological Sciences, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- Wiegant, W. (1987). *The "spaghetti theory" on anaerobic sludge formation, or the inevitability of granulation*. In: Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J.T.C., Pol, L.W.H. (Eds.), *Granular Anaerobic Sludge, Microbiology and Technology*. The Netherlands. Pudoc, Wageningen.
- Yan, Y. G., & Tay, J. H. (1997). Characterisation of the granulation process during UASB start-up. *Water Research*, 1573-1580.
- 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.*
- Zhang, T., & Noike, T. (1994). Influence of retention time on reactor performance and bacterial trophic populations in anaerobic digestion.