



Título del Trabajo Fin de Máster:

***PUESTA A PUNTO DE UNA
METODOLOGÍA PARA LA
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
METANOGENÉTICA ESPECÍFICA (AME)
DE UN FANGO ANAEROBIO
MEDIANTE EL SISTEMA OXITOP[®].
INFLUENCIA DE LAS PRINCIPALES
VARIABLES EXPERIMENTALES.***

Intensificación:

TRATAMIENTO DE AGUAS

Autor:

ORTIZ JORDÁ, VERÓNICA

Director/es:

DR. FERRER POLO, JOSÉ

DRA. MARTÍ ORTEGA, NURIA

Septiembre, 2011

RESUMEN



RESUMEN

La Actividad Metanogénica Específica (AME) permite cuantificar la máxima capacidad de producción de metano por el grupo de microorganismos presente en lodos anaerobios. La AME, además de ser usada para el seguimiento de la calidad del lodo en reactores anaerobios, es una herramienta que evalúa el comportamiento de la biomasa contaminada y determina la carga orgánica máxima que puede aplicarse a un sistema con el fin de examinar la capacidad de tratamiento, la toxicidad de determinados sustratos y la posibilidad de selección de inóculos. Esta herramienta no cuenta con un protocolo estandarizado que facilite la comparación de resultados. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la influencia de las condiciones de incubación en el ensayo de la AME con el fin de estandarizar el protocolo.

Se planificaron experimentos para evaluar la influencia del espacio de cabeza, la temperatura, el tipo y concentración de sustrato, la relación sustrato/inóculo (S/I), la concentración de tampón, el tipo de agitación y la conductividad. El método empleado para la determinación del metano generado fue el método manométrico mediante el sistema OxiTop®.

Los mejores valores de AME fueron obtenidos con volúmenes de espacio de cabeza pequeños (20-25% del volumen total), a una temperatura de 35 °C y con una concentración de tampón K_2HPO_4 de 0,1808 g/0,3l y KH_2PO_4 de 0,1020 g/0,3l. El intervalo de concentraciones que proporcionó los mejores resultados varió desde 0,2 hasta 2,0 g/l, una mayor concentración de acetato causó inhibición. Los mejores resultados en cuanto a la relación S/I se dieron para una concentración que varió entre 0,03 y 0,3 g/l. La agitación fue manual puesto que de este modo se evitaba romper las asociaciones sintróficas que se establecen entre los diferentes grupos de bacterias que realizan la degradación anaeróbica de sustratos complejos. Por último, con el estudio de la conductividad, se comprobó que el motivo por el cual elevadas concentraciones de sustrato producían inhibición era debido al aporte de elevadas concentraciones de iones que aumentaban la salinidad del medio y provocaba la muerte de las bacterias por el

fenómeno de la ósmosis, por el cual, se tiende a igualar las concentración entre el interior celular y el medio. Este parámetro resultó ser el más influyente en el estudio de la AME.

RESUM

L'Activitat metanogènica Específica (AME) permet quantificar la màxima capacitat de producció de metà pel grup de microorganismes present en fangs anaerobis. La AME, a més de ser utilitzada per al seguiment de la qualitat del fang en reactors anaerobis, és una eina que avalua el comportament de la biomassa contaminada i determina la càrrega orgànica màxima que pot aplicar-se a un sistema, per tal d'examinar la capacitat de tractament, toxicitat de determinats substrats i la possibilitat de selecció de inòculs. Aquesta eina no compta amb un protocol estandaritzat que faciliti la comparació de resultats. Per tant, l'objectiu principal d'aquest treball va ser avaluar la influència de les condicions d'incubació en l'assaig de la AME per tal d'estandaritzar el protocol.

Es van planificar experiments per avaluar l'influència de l'espai de cap, la temperatura, el tipus i concentració de substrat, la relació substrat / inòcul (S/I), la concentració de tampó, el tipus d'agitació i la conductivitat. El mètode emprat per determinar el metà va ser el mètode manomètric mitjançant el sistema OxiTop®.

Els millors valors d'AME van ser obtinguts amb volums d'espai de cap menuts (20-25% del volum total), a una temperatura de 35 °C i amb una concentració de tampó K_2HPO_4 de 0,1808 g/0,3l i KH_2PO_4 de 0,1020 g/0,3l. L'interval de concentració de substrat que va proporcionar els millors resultats va variar des 0,2 fins a 2,0 g/l ja que una major concentració d'acetat va causar inhibició. Els millors resultats pel que fa a la relació S/I es van donar per a una concentració que varia entre 0,03 i 0,3 g/l. L'agitació va ser manual ja que d'aquesta manera s'evitava trencar les associacions sintròfiques que s'estableixen entre els diferents grups de bacteris que formen la cadena de degradació anaeròbica de substrats complexos. Finalment, amb l'estudi de la conductivitat es va comprovar que el motiu pel qual elevades concentracions de substrat produïen inhibició era degut a l'aportació d'elevades concentracions d'ions ja que augmentaven la salinitat del medi i provocava la mort dels bacteris pel fenomen de l'osmosi, pel qual, es tendeix a igualar les concentracions entre l'interior cel·lular i el medi. Aquest paràmetre va resultar ser el més influent en l'estudi de la AME.

ABSTRACT

The specific methanogenic activity (SMA) allows the quantification of the maximum capacity of the methane production by the microorganism population in anaerobic sludges. The SMA is used for the monitoring of the sludge quality in anaerobic reactors, is also a tool which evaluates the biomass toxicity behaviour and establish the maximum organic loading rate that can be applied to a system in order to study the treatment capacity, toxicity of certain substrates and the possibility of selection of inoculum. This parameter doesn't have a standard protocol which could provide an easier comparison of the results. Therefore, the main objective of this project is the standardization of the protocol from in order to achieve protocol standardization.

Experiments were planned to evaluate the influence of the headspace volume, the temperature, the type and the substrate concentration, the substrate/inoculum (S/I) ratio, the buffer concentration, the agitation type and the conductivity. The method used for the determination of the methane was the manometric method with the OxiTop® equipment.

The best SMA values were obtained with small headspace volumes (20-25% of the total volume), a 35°C temperature and with a K_2HPO_4 buffer concentration 0.1808 g/0,3l and a KH_2PO_4 0,1020 g/0,3l. The concentration ratio of substrate provided the best results varied from 0.2 until 2.0 g/l because a higher concentration of acetate caused bacteria inhibition. The best S/I ratio varied between 0.03 and 0.3 g/l. The agitation was manual because it avoided to break the syntrophic associations among the different bacteria groups which anaerobically descompose the complex substrates. Finally, the conductivity test proved that the reason because a high substrate concentrations produce inhibition is the higher input of ion concentrations which increased the medium salinity and caused the death of the bacteria by the osmosis, which tend to equalize the concentration between inside the cell and the environment. This parameter was the most influent on the SMA test.

INDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	19
1.1	Importancia del tratamiento anaerobio. Ventajas y desventajas sobre el tratamiento aerobio.....	21
1.2	Etapas de la digestión anaerobia.....	22
1.2.1	<i>Hidrólisis</i>	24
1.2.2	<i>Etapa fermentativa o acidogénica</i>	26
1.2.3	<i>Etapa acetogénica</i>	28
1.2.4	<i>Etapa metanogénica</i>	30
1.3	Influencia de los parámetros ambientales y de control.....	31
1.3.1	<i>Temperatura</i>	31
1.3.2	<i>pH y alcalinidad</i>	33
1.3.3	<i>Nutrientes</i>	35
1.3.4	<i>Inhibidores</i>	35
1.3.5	<i>Agitación</i>	38
2.	OBJETIVOS.....	43
3	MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1	Fango anaerobio.....	47
3.2	Método experimental	47
3.2.1	<i>Método de cuantificación del metano</i>	47
3.2.2	<i>Montaje experimental</i>	49
3.3	Métodos analíticos.....	52
3.3.1	<i>Determinación de sólidos totales y volátiles</i>	52
3.3.2	<i>Determinación de la concentración de tampón</i>	53
3.3.3	<i>Determinación del pH</i>	55
3.3.4	<i>Determinación de la temperatura</i>	55

3.3.5	<i>Determinación de la conductividad y salinidad.....</i>	56
3.3.6	<i>Determinación del contenido de CH₄ en el biogás.....</i>	57
3.3.6.1	<i>Volumen de CH₄ experimental.....</i>	58
3.3.6.2	<i>Volumen de CH₄ teórico.....</i>	62
3.3.6.3	<i>Volumen de CH₄ del cromatógrafo.....</i>	63
3.3.7	<i>Determinación de la AME.</i>	64
4	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	71
4.1	Análisis cromatográfico del biogás.....	71
4.2	Influencia del volumen del espacio de cabeza	72
4.3	Influencia de la temperatura de incubación.....	76
4.4	Influencia del sustrato.....	79
4.4.1	<i>Tipo de sustrato.....</i>	79
4.4.2	<i>Concentración de sustrato</i>	81
4.5	Influencia de la relación sustrato/inóculo	88
4.6	Influencia de la concentración de tampón	90
4.7	Influencia del tipo de agitación.....	95
4.8	Influencia de la conductividad	96
5	CONCLUSIONES.....	103
	REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA.	107
	ANEXO I. TABLA RESUMEN	

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Diferencias entre el tratamiento anaerobio y el aerobio.</i>	22
<i>Tabla 2. Principales reacciones acetogénicas.</i>	29
<i>Tabla 3. Principales reacciones metanogénicas y otras consumidoras de hidrógeno (adaptada de Stams, 1994).</i>	31
<i>Tabla 4. Composición de la solución de nutrientes y elementos traza.</i>	50
<i>Tabla 5. Características de los ensayos para el estudio de la influencia del espacio de cabeza.</i>	73
<i>Tabla 6. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia del espacio de cabeza.</i>	74
<i>Tabla 7. Comparación de los porcentajes de CH_4 en los ensayos de la influencia del espacio de cabeza.</i>	75
<i>Tabla 8. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la temperatura de incubación.</i>	76
<i>Tabla 9. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la temperatura de incubación.</i>	78
<i>Tabla 10. Comparación de los porcentajes de CH_4 en los ensayos de la influencia de la temperatura de incubación.</i>	79
<i>Tabla 11. Características de los ensayos para el estudio de la influencia del tipo de sustrato.</i>	80
<i>Tabla 12. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia del tipo de sustrato.</i>	80
<i>Tabla 13. Comparación de los porcentajes de CH_4 en los ensayos de la influencia del tipo de sustrato.</i>	81
<i>Tabla 14. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones bajas de sustrato.</i>	82
<i>Tabla 15. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones bajas de sustrato.</i>	83
<i>Tabla 16. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones altas de sustrato.</i>	84

<i>Tabla 17. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones altas de sustrato.</i>	<i>85</i>
<i>Tabla 18. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones muy altas de sustrato.</i>	<i>86</i>
<i>Tabla 19. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones muy altas de sustrato.</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 20. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la relación S/I.</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 21. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la relación S/I.</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 22. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de tampón.</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 23. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de tampón.</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 24. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de tampón. Comprobación de la concentración elegida como óptima.</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 25. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de tampón. Comprobación de la concentración elegida como óptima.</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 26. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la conductividad.</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 27. Concentraciones añadidas de iones K^+ y Na^+ en cada muestra para el estudio de la influencia de la conductividad. Salinidad total y valores medidos de conductividad.</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 28. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la conductividad.</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 29. Condiciones óptimas para el estudio de la AME.</i>	<i>104</i>

INDICE DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1. Comparación entre valores de metano teóricos esperados y valores experimentales de tres muestras de ensayos diferentes.</i>	<i>67</i>
<i>Gráfico 2. Análisis cromatográfico de una muestra de biogás.</i>	<i>71</i>
<i>Gráfico 3. Influencia del volumen de espacio de cabeza en el incremento de presión.</i>	<i>74</i>
<i>Gráfico 4. Influencia del volumen del espacio de cabeza en la AME.</i>	<i>75</i>
<i>Gráfico 5. Influencia de la temperatura de incubación en el periodo de latencia y en la producción máxima de CH₄ de las bacterias.</i>	<i>77</i>
<i>Gráfico 6. Influencia de la temperatura de incubación en la AME.</i>	<i>78</i>
<i>Gráfico 7. Influencia del tipo de sustrato en la AME.</i>	<i>81</i>
<i>Gráfico 8. Influencia de la concentración de sustrato en la AME. Concentraciones bajas de sustrato.</i>	<i>84</i>
<i>Gráfico 9. Influencia de la concentración de sustrato en la AME. Concentraciones altas.</i>	<i>86</i>
<i>Gráfico 10. Influencia de la concentración de sustrato en la AME. Concentraciones muy altas. ..</i>	<i>88</i>
<i>Gráfico 11. Influencia de la relación S/I en la AME.</i>	<i>90</i>
<i>Gráfico 12. Efecto de la reabsorción del CO₂ por el uso del tampón NaHCO₃.</i>	<i>91</i>
<i>Gráfico 13. Influencia de la concentración de tampón en la AME.</i>	<i>93</i>
<i>Gráfico 14. Influencia de la concentración de tampón en la AME. Comprobación de la concentración elegida como óptima.</i>	<i>95</i>
<i>Gráfico 15. Influencia de la conductividad en la AME.</i>	<i>99</i>

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Cuadro comparativo entre el proceso aerobio y anaerobio..</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2. Conjunto de reacciones que producen la digestión anaerobia. Relaciones de sintrófia.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 3. Simplificación de las rutas metabólicas de degradación de la glucosa por las bacterias acidogénicas (Mosey, 1993).</i>	<i>27</i>
<i>Figura 4. Influencia de la temperatura en la tasa de crecimiento de los organismos metanogénicos.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 5. Método manométrico..</i>	<i>48</i>
<i>Figura 6. Esquema del montaje experimental del método volumétrico.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 7. Botella vacía utilizada en los ensayos AME.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 8. Esquema montaje experimental de la botella en el ensayo de la AME.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 9. Determinación de ST y SV.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 10. Termómetro de laboratorio.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 11. Conductímetro de laboratorio.</i>	<i>56</i>

Capítulo 1
INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia es un proceso bioquímico en el cual un grupo de diferentes tipos de microorganismos, en ausencia de oxígeno molecular, promueve la transformación de compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, proteínas y lípidos) en productos más simples como metano, gas carbónico, gas sulfhídrico y amonio. Los microorganismos que participan en la digestión anaerobia actúan por medio de reacciones específicas secuenciales, las cuales cuentan con bacterias especializadas en cada una de ellas (Foresti *et al.*, 1999).

En el arranque de reactores anaerobios, el inicio está caracterizado por una baja actividad biológica, relacionada con el crecimiento de las bacterias acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas como biomasa dispersa y adherida. Tradicionalmente la puesta en marcha o arranque es la etapa considerada más inestable y crítica en el proceso anaerobio, por lo que debe iniciarse con tiempos de retención hidráulicos elevados, para asegurar una buena asimilación del sustrato por parte de las bacterias y mantener una carga orgánica inicial baja, la cual puede ir aumentando a medida que el reactor se estabiliza. Durante esta etapa, la determinación de la AME del fango se lleva a cabo realizando un seguimiento de los parámetros fisicoquímicos. En este sentido, la actividad metanogénica específica (AME) es un parámetro que se utiliza para determinar la capacidad que tienen las bacterias metanogénicas para producir biogás, permitiendo clasificar el potencial de la biomasa para convertir el sustrato en metano y gas carbónico bajo diferentes condiciones ambientales (Penna, 1994).

Además de cómo un indicador del adecuado arranque de un reactor anaerobio, la AME puede ser usada como análisis de rutina para cuantificar la actividad de la población metanogénica, además de ofrecer otras aplicaciones como son: evaluar el comportamiento de la biomasa bajo el efecto de compuestos potencialmente inhibidores, determinar la toxicidad relativa de compuestos químicos presentes en efluentes, establecer el grado de degradabilidad de diversos sustratos, monitorizar los

cambios de actividad del lodo debido a una posible acumulación de materiales inertes, determinar la carga orgánica máxima que puede ser aplicada para un determinado tipo de lodo y evaluar parámetros cinéticos (Chernicharo, 2007).

La AME puede definirse como la máxima capacidad de producción de metano por un grupo de microorganismos anaerobios, realizada en condiciones controladas de laboratorio que permita la máxima actividad bioquímica de conversión del sustrato orgánico a metano (Chernicharo, 2007). Las unidades en las que se expresa son mg DQO/g SSV · día, o ml CH₄/g SSV · día.

El conocimiento de la AME de un lodo permite establecer la capacidad máxima de eliminación de DQO de la fase líquida, permitiendo estimar la carga orgánica máxima que puede ser aplicada a un reactor impidiendo su desestabilización; asimismo, la AME también permite determinar la concentración mínima de biomasa requerida en el reactor para garantizar la reducción de la carga orgánica aplicada (Aquino *et al.*, 2007).

En la actualidad todavía existen diferentes protocolos a nivel mundial para la medición de la AME, los cuales presentan diferencias en términos de la concentración de inóculo, tipo y concentración del sustrato, relación sustrato/inóculo, concentración de nutrientes y temperatura de incubación. La ausencia de un método estandarizado dificulta la replicación o comparación de resultados obtenidos en diferentes estudios y limita la aplicación y difusión de la metodología AME como herramienta de control de los procesos anaerobios.

En las siguientes páginas se presenta una revisión del tratamiento anaerobio de la materia orgánica así como de sus principales parámetros ambientales y de control.

1.1 Importancia del tratamiento anaerobio. Ventajas y desventajas sobre el tratamiento aerobio.

Los tratamientos anaerobios y aerobios constituyen las dos grandes alternativas de depuración biológica de aguas residuales y residuos orgánicos. El hecho de no necesitar aireación y la generación de un biogás que se puede utilizar en la misma planta con finalidades energéticas hacen que la digestión anaerobia resulte energéticamente muy favorable, permitiendo en muchos casos la autonomía o autosuficiencia de las plantas de tratamiento. Otro aspecto muy ventajoso es el hecho de generar lodos de depuración en una cantidad muy inferior a la que se obtiene en los procesos aerobios: la cantidad de lodo residual se puede situar entre un 5% y un 20% de la carga orgánica eliminada, frente al 50-60% del proceso aerobio.

Por ello, la reducción de los costes energéticos y de los costes derivados de la gestión de lodos ha convertido la digestión anaerobia en la alternativa más competitiva para el tratamiento y/o pretratamiento de muchos efluentes residuales. En la Figura 1 y Tabla 1 se observan esquemáticamente las diferencias entre el tratamiento anaerobio y el aerobio.

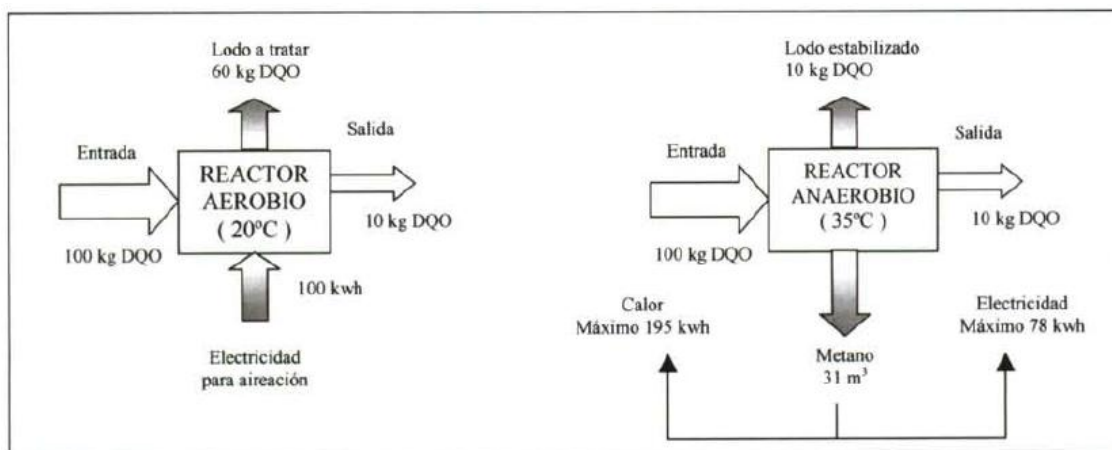


Figura 1. Cuadro comparativo entre el proceso aerobio y anaerobio. Mediante el proceso anaerobio se puede obtener energía. Al mismo tiempo, la cantidad de lodo formado es 5 veces inferior, y mejor estabilizado, que en el caso del proceso aerobio (Soto, 1994).

PROCESO AEROBIO	PROCESO ANAEROBIO
<ul style="list-style-type: none"> - Mejor eficacia de la eliminación. - Operatividad comprobada. - 50% del C es convertido en CO₂, 40-50% es incorporado dentro de la biomasa. - 60% de la energía es almacenada en la nueva biomasa, 40% es perdida como calor. - Requiere elevada energía para aireación. - Limitación de cargas orgánicas. - Requiere adición de nutrientes. - Necesidades de grandes áreas. - Sensibilidad a economía a escala. - Periodos de arranque cortos. - Tecnología establecida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor producción de lodos. - Menores costes de operación. - 90% de C es convertido en biogás. 10% es transformado en biomasa. - 90% de la energía es retirada como CH₄, 3-5% es perdida como calor, 5-7% es almacenada en la biomasa. - No requiere energía. - Acepta altas cargas orgánicas. - Degrada compuestos policlorados. - Baja demanda de nutrientes. - Demanda baja de área superficial. - Largos periodos de arranques. - Recientemente establecida, aun bajo desarrollo para aplicaciones específicas.

Tabla 1. Diferencias entre el tratamiento anaerobio y el aerobio.

1.2 Etapas de la digestión anaerobia.

La digestión anaerobia es un proceso muy complejo tanto por el número de reacciones bioquímicas que tienen lugar como por la cantidad de microorganismos involucrados en ellas. De hecho, muchas de estas reacciones ocurren de forma simultánea.

Los estudios bioquímicos y microbiológicos realizados hasta ahora, dividen el proceso de descomposición anaerobia de la materia orgánica en cuatro fases o procesos:

- Hidrólisis
- Etapa fermentativa o acidogénica
- Etapa acetogénica
- Etapa metanogénica

La primera fase es la hidrólisis de partículas y molécula complejas (proteínas de carbono y lípidos) que son hidrolizadas por enzimas extracelulares producidas por los microorganismos acidogénicos o fermentativos. Como resultado se producen compuestos solubles más sencillos (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga) que son fermentados por las bacterias acidogénicas dando lugar, principalmente, a ácidos grasos de cadena cota, alcoholes, hidrogeno, dióxido de carbono y otros productos intermedios. Los ácidos grasos de cadena corta son transformados en acido acético, hidrogeno y dióxido de carbono, mediante la acción de los microorganismos acetogénicos. Por último, los microorganismos metanogénicos producen metano a partir de acético, H₂ Y CO₂.

En la Figura 2 se muestra esquemáticamente las distintas fases del proceso de digestión anaerobia, los microorganismos que intervienen en cada una de ellas y los productos intermedios generados.

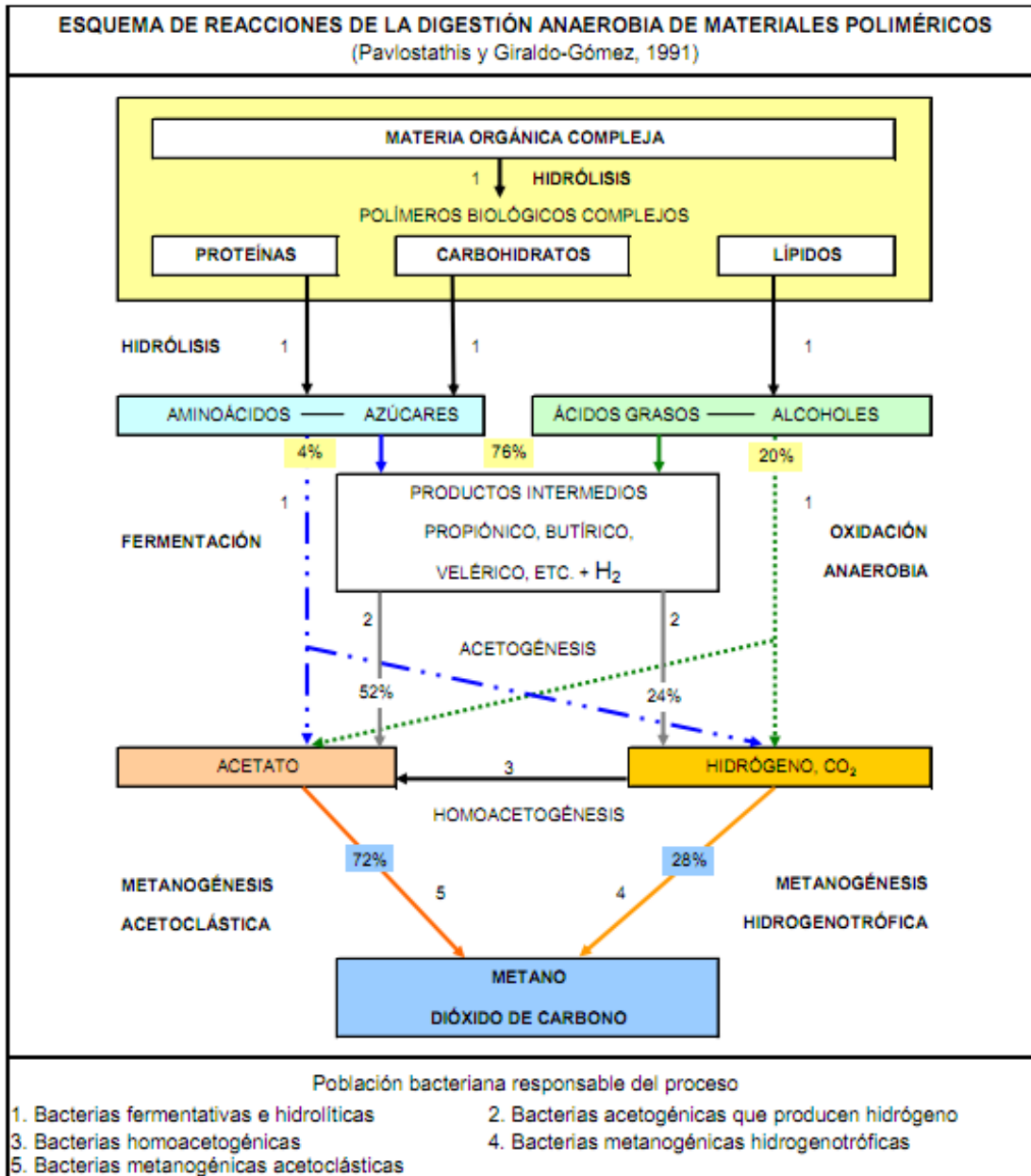


Figura 2. Conjunto de reacciones que producen la digestión anaerobia. Relaciones de sintrófia.

1.2.1 Hidrólisis

La hidrólisis de la materia orgánica polimérica a compuestos solubles o monómeros es el paso inicial para la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos, ya que los microorganismos únicamente pueden utilizar materia orgánica soluble que pueda atravesar su pared celular. Por tanto, es el proceso de hidrólisis el que proporciona sustratos

orgánicos para la digestión anaerobia. Como ya se ha comentado, la hidrólisis de estas moléculas complejas es llevada a cabo por la acción de enzimas extracelulares producidas por los microorganismos hidrolíticos.

La etapa hidrolítica puede ser el proceso limitante de la velocidad global del proceso sobre todo cuando se tratan residuos con alto contenido en sólidos (Pavlosthatis y Giraldo Gómez, 1991). Además, la hidrólisis depende de la temperatura del proceso, del tiempo de retención hidráulico, de la composición del sustrato (porcentaje de lignina, carbohidratos, proteínas y grasas), del tamaño de partículas, del pH, de la concentración de NH_4^+ y de la concentración de los productos de la hidrólisis (Speece, 1983).

Cualquier sustrato se compone de tres tipos básicos de macromoléculas: hidratos de carbono, proteínas y lípidos:

Las *proteínas* constituyen un sustrato muy importante en el proceso de digestión anaerobia ya que además de ser fuente de carbono y energía, los aminoácidos derivados de sus hidrólisis tienen un elevado valor nutricional. Las proteínas son hidrolizadas en péptidos y aminoácidos por la acción de enzimas proteolíticas llamadas proteasas. Parte de estos aminoácidos son utilizados directamente en la síntesis de nuevo material celular y el resto son degradados a ácidos volátiles, dióxido de carbono, hidrogeno, amonio y sulfuro en posteriores etapas del proceso.

La degradación de los *lípidos* en ambientes anaerobios comienza con la ruptura de las grasas por la acción de enzimas hidrolíticas denominadas lipasas produciendo ácidos grasos de cadena larga y glicerol.

La velocidad de degradación de los materiales lignocelulósicos, compuestos principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, es tan lenta que suele ser la etapa limitante del proceso de hidrólisis y por tanto, de la degradación anaerobia de determinados sustratos.

Esto es debido a que la lignina es muy resistente a la degradación por parte de los microorganismos anaerobios, afectando también a la biodegradabilidad de la celulosa, de la hemicelulosa y de otros hidratos de carbono. Los principales productos de la hidrólisis de la celulosa son celobiasa y glucosa, mientras que la hemicelulosa produce pentosa, hexosa y ácidos urónicos.

1.2.2 Etapa fermentativa o acidogénica

Las moléculas orgánicas solubles son fermentadas por varios organismos fermentativos formando compuestos que pueden ser utilizados directamente por las bacterias metanogénicas (acético, fórmico, H₂) y compuestos orgánicos más reducidos (láctico, etanol, propiónico, butírico, principalmente) que tienen que ser oxidados por bacterias acetogénicas a substratos que puedan utilizar las metanogénicas (Stams, 1994). Las proporciones entre los productos de la fermentación varían en función del consumo de H₂ por parte de las bacterias que utilizan hidrógeno. Cuando el H₂ es eliminado de forma eficiente las bacterias fermentativas no producen compuestos reducidos como el etanol, favoreciendo la producción de H₂ y la liberación de energía en forma de ATP (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991). La actividad de algunas bacterias fermentativas y acetogénicas depende de la concentración de H₂, siendo posible sólo a valores muy bajos de presión parcial de H₂. La eliminación continua de H₂ mediante oxidación por CO₂ (bacterias metanogénicas hidrogenotróficas) estimula la acción de las bacterias fermentativas, al eliminar un producto de la reacción.

Fermentación de carbohidratos solubles.

La principal ruta metabólica de degradación de glucosa para formar ácidos orgánicos es la de Embden-Meyerhof (Figura 3), que tiene como principal intermediario el piruvato.

La fermentación de azúcares se realiza por diversos tipos de microorganismos, siguiendo diferentes rutas metabólicas, en función del organismo responsable, y obteniendo productos finales diferentes.

Los principales microorganismos son los que producen butírico o butanol, básicamente del género *Clostridium*, que convierten la glucosa y algunos aminoácidos en ácido butírico, acético, CO_2 y H_2 . La glucosa se convierte en piruvato mediante la ruta Embden-Meyerhof, y el piruvato se desdobra a Acetil-CoA y CO_2 (Madigan *et al.*, 1998). El Acetil-CoA se reduce en los productos de fermentación empleando como transportador de electrones el NADH derivado de las reacciones glucolíticas de la ruta Embden-Meyerhof. Las proporciones de los diversos productos se modifican por la duración y las condiciones de la fermentación, siendo el butírico y el acético los productos mayoritarios si el pH se mantiene alcalino (Madigan *et al.*, 1998).

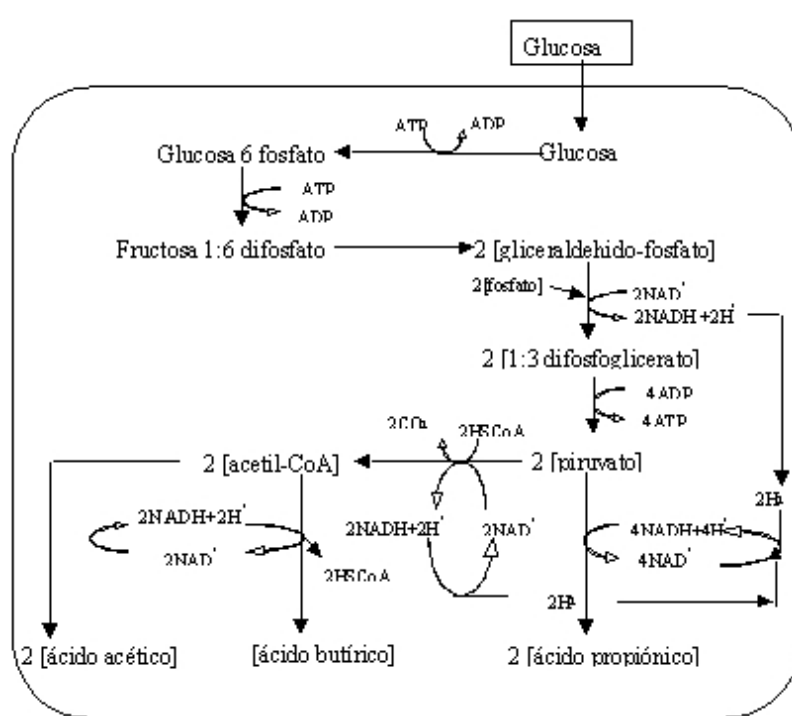


Figura 3. Simplificación de las rutas metabólicas de degradación de la glucosa por las bacterias acidogénicas (Mosey, 1993).

Fermentación de aminoácidos

Los principales productos de la fermentación de aminoácidos y de otras moléculas hidrogenadas son ácidos grasos de cadena corta, succínico, aminovalérico y H_2 . La fermentación de aminoácidos se considera un proceso rápido y que, en general, no limita la velocidad de degradación de compuestos proteicos.

Las bacterias proteolíticas que mayoritariamente se han identificado, pertenecen al género *Clostridium*, aunque otras especies tales como *Peptococcus* y *Bacteroides* también están presentes.

Los productos finales de la oxidación son NH_3 , CO_2 y un ácido carboxílico con un átomo de carbono menos que el aminoácido oxidado (n-butírico y ácido isobutírico, isovalérico, caproico, sulfuro de hidrógeno, metilcaptano, cadaverina, putrescina, etc, según el aminoácido del que proceda).

1.2.3 Etapa acetogénica

Mientras que algunos productos de la fermentación pueden ser metabolizados directamente por los organismos metanogénicos (H_2 y acético), otros (etanol, ácidos grasos volátiles como valerato, butirato, propionato, etc. y algunos compuestos aromáticos) deben ser transformados en productos más sencillos, acetato y H_2 , a través de las bacterias acetogénicas. Representantes de los microorganismos acetogénicos son *Syntrophomonas wolfei* y *Syntrophobacter wolini*.

Desde el punto de vista termodinámico, estas reacciones no son posibles porque en condiciones estándar ($\text{pH}=7$, $T=25^\circ\text{C}$, $P=1$ atm), presentan energías libres de reacción positivas, tal y como se muestra en la Tabla 2.

Reacciones acetogénicas	$\Delta G^{\circ\prime}$ (KJ)
Etanol y láctico	
$Etanol + H_2O \rightarrow Acetato + H^+ + 2H_2$	+9,6
$Lactato^{-1} + 2H_2O \rightarrow Acetato^{-1} + H^+ + 2H_2 + HCO_3^{-}$	-4,2
Acidos Grasos	
$Acetato^{-1} + 4H_2O \rightarrow H^+ + 4H_2 + 2HCO_3^{-}$	+104,6
$Pr opionato^{-1} + 3H_2O \rightarrow Acetato^{-1} + HCO_3^{-} + H^+ + 3H_2$	+76,1
$Butirato^{-1} + 2H_2O \rightarrow 2Acetato^{-1} + H^+ + 2H_2$	+48,1
$Valerato^{-1} + 3H_2O \rightarrow 3Acetato^{-1} + 2H^+ + 4H_2$	+96,2
Aminoácidos	
$Alanina + 3H_2O \rightarrow Acetato^{-1} + HCO_3^{-} + NH_4^+ + H^+ + 2H_2$	+7,5
$Aspartato^{-1} + 4H_2O \rightarrow Acetato^{-1} + 2HCO_3^{-} + NH_4^+ + H^+ + 2H_2$	-14,0
$Leucina + 3H_2O \rightarrow isovalerato^{-1} + HCO_3^{-} + NH_4^+ + H^+ + 2H_2$	+4,2
$Glutamato^{-1} + 4H_2O \rightarrow propionato^{-1} + 2HCO_3^{-} + NH_4^+ + H^+ + 2H_2$	-5,8
$Glutamato^{-1} + 7H_2O \rightarrow acetato^{-1} + 3HCO_3^{-} + NH_4^+ + 3H^+ + 5H_2$	+70,3

Tabla 2. Principales reacciones acetogénicas.

Sin embargo, a presiones parciales de H₂ bajas (del orden de 10⁻⁴ – 10⁻⁵ atm), estas reacciones pasan a ser termodinámicamente favorables y la variación de energía libre es suficiente para permitir la síntesis de ATP y el crecimiento bacteriano. Por tanto, el principal inhibidor de la acetogénesis, cuya acumulación provoca la rápida acumulación de sustratos, es la acumulación de hidrogeno molecular. Un tipo especial de microorganismos acetogénicos, son los llamados homoacetogénicos. Este tipo de bacterias son capaces de crecer heterotróficamente en presencia de azúcares o compuestos monocarbonados (como la mezcla H₂/CO₂) produciendo como único producto acetato. Al contrario que las bacterias acetogénicas, éstas no producen hidrógeno como resultado de su metabolismo, sino que lo consumen como sustrato.

En el presente trabajo, puesto que se busca maximizar la producción de metano, son estas las bacterias de las cuales se pretende optimizar el crecimiento.

1.2.4 Etapa metanogénica

Los microorganismos metanogénicos pueden ser considerados como los más importantes dentro del consorcio de microorganismos anaerobios, ya que son los responsables de la formación de metano y de la eliminación del medio de los productos de los grupos anteriores. Las bacterias metanogénicas sintetizan el metano a partir de sustratos como: acetato, H₂, CO₂.

Los organismos metanogénicos se clasifican dentro del dominio Archaea, y, morfológicamente, pueden ser bacilos cortos y largos, cocos de varias ordenaciones celulares, células en forma de placas y metanógenos filamentosos, existiendo tanto Gram positivos como Gram negativos. Se pueden establecer dos grandes grupos de microorganismos, en función del sustrato principal, dividiéndose en los hidrogenofílicos, que consumen hidrógeno, y los acetoclásticos, que consumen acetato.

La mayoría de los organismos metanogénicos son capaces de utilizar el H₂ como aceptor de electrones, mientras que sólo dos géneros son capaces de utilizar el acetato. A pesar de ello, en ciertos ambientes anaerobios, éste es el principal precursor del metano, considerándose que alrededor del 70% del metano producido en los reactores anaerobios se forma a partir de acetato.

<i>Reacciones hidrogenotróficas</i>	ΔG^0 (KJ)
$4H_2 + H^+ + 2HCO_3^- \rightarrow \text{Acetato} + 4H_2O$	-104.6
$4H_2 + 4S^0 \rightarrow 4HS^- + 4H^+$	-112
$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135.6
$4H_2 + 4SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$	-151.9
$4H_2 + 4\text{fumarato} \rightarrow 4\text{succinato}$	-344.6
$4H_2 + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow NH_4^+ + 3H_2O$	-599.6
<i>Interconversión formato-hidrógeno</i>	
$H_2 + HCO_3^- \rightarrow \text{formato} + H_2O$	-1.3
<i>Metanogénesis acetoclástica</i>	
$\text{Acetato} + H_2O \rightarrow HCO_3^- + CH_4$	-31.0
<i>Metanogénesis a partir de otros substratos</i>	
<i>Formiato</i>	
$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	
<i>Metanol</i>	
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	
<i>Trietil-aminas</i>	
$4(CH_3)_3N + 6H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_3$	
<i>Di-etil-aminas</i>	
$2(CH_3)_2NH + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_3$	
<i>Monometil-aminas</i>	
$4(CH_3)NH_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_3$	

Tabla 3. Principales reacciones metanogénicas y otras consumidoras de hidrógeno (adaptada de Stams, 1994).

1.3 Influencia de los parámetros ambientales y de control.

1.3.1 Temperatura

La velocidad de reacción de los procesos biológicos depende de la velocidad de crecimiento de los microorganismos involucrados que a su vez, dependen de la temperatura. A medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos y se acelera el proceso de digestión dando lugar a mayores producciones de biogás.

La temperatura de operación del digestor, está considerada uno de los principales parámetros de diseño, debido a la gran influencia de este factor en la velocidad de

digestión anaerobia. Variaciones bruscas de temperatura en el digester pueden provocar la desestabilización del proceso.

Existen tres rangos de temperatura en los que pueden trabajar los microorganismos anaerobios: psicrófilico (por debajo de 25°C), mesófilico (entre 25 y 45°C) y termófilico (entre 45 y 65°C), siendo la velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) mayor conforme aumenta el rango de temperaturas. Dentro de cada rango de temperatura, existe un intervalo para el cual dicho parámetro se hace máximo, determinando así la temperatura de trabajo óptima en cada uno de los rangos posibles de operación.

Hasta el momento, el rango psicrófilico ha sido poco estudiado y, en general, se plantea como poco viable debido al gran tamaño del reactor necesario. Sin embargo, presenta menores problemas de estabilidad que en los otros rangos de operación.

El régimen mesófilico de operación es el más utilizado a pesar de que en la actualidad se está utilizando cada vez más el rango termófilico para conseguir una mayor velocidad del proceso. Sin embargo, el régimen termófilico suele presentar mayores problemas de inhibición del proceso por la mayor toxicidad de determinados compuestos a elevadas temperaturas, como el nitrógeno amoniacal o los ácidos grasos de cadena larga.

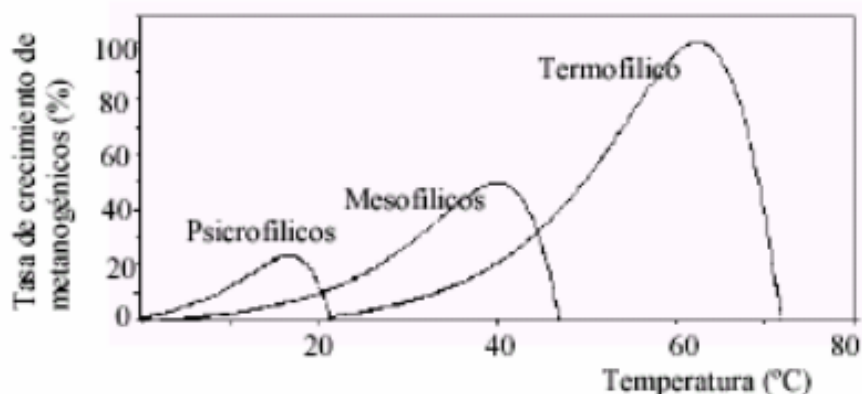


Figura 4. Influencia de la temperatura en la tasa de crecimiento de los organismos metanogénicos.

Una técnica interesante es la combinación de dos fases de digestión, una primera termofílica de elevada carga orgánica y una segunda mesofílica con menor carga. Con este sistema se aprovechan las ventajas del sistema termofílico pero se reducen los problemas de inestabilidad.

La temperatura del proceso actúa también sobre aspectos físico-químicos del mismo. La solubilidad de los gases generados desciende al aumentar la temperatura, favoreciéndose la transferencia líquido-gas. Esto supone un efecto positivo para el caso de gases tales como NH_3 , H_2 y H_2S , dada su toxicidad sobre el crecimiento de los microorganismos anaerobios. Una posible desventaja de este fenómeno es que el descenso de la solubilidad del CO_2 provocaría un aumento del pH, lo que generaría, en fangos de elevada concentración de amonio, posibles situaciones de inhibición por NH_3 . Por otra parte, la solubilidad de la mayoría de las sales aumenta con la temperatura de manera que la materia orgánica es más accesible para los microorganismos aumentando así la velocidad del proceso. Por último, la viscosidad de sólidos y semisólidos disminuye al aumentar la temperatura lo que implica menores necesidades de agitación.

1.3.2 pH y alcalinidad

Cada grupo de microorganismos involucrados en la degradación anaeróbica tiene un rango de pH óptimo para su crecimiento: para los microorganismos acidogénicos el pH óptimo es alrededor de 6, mientras que para los microorganismos acetogénicos y metanogénicos el pH óptimo es alrededor de 7. Sin embargo, existe mucha dispersión en la bibliografía sobre el pH óptimo de unos y otros microorganismos. Algunos autores exponen que la mayoría de los metanogénicos funcionan en un rango de pH entre 6.5 y 8.2 (Speece, 1996), mientras que otros (Hammad *et al.*, 1999) sugieren un rango entre 5 y 8, siendo el óptimo entre 7.0 y 7.2.

Un pH ácido indica el inicio del proceso anaerobio, cuando la actividad de las bacterias acidogénicas es mayor que las otras, se producen y acumulan altos volúmenes de ácidos

orgánicos y el pH comienza a descender, un nivel de pH inhibitorio para los metanogénicos es de 6.4 (Monnet, 2004).

Por otra parte, la metanogénesis puede dar lugar a una concentración más alta de amoníaco, aumentando el pH hasta 8.0, lo cual impedirá la acidogénesis (Lusk, 1999). Esto puede ser reversible alimentando una mayor cantidad de materia fresca, que estimulará la etapa de acidogénesis y por consecuencia la formación de ácidos orgánicos. Cuando la acumulación de metano aumenta rápidamente indica que hay un balance en las etapas.

El pH durante la primera etapa puede ser ácido y bajar aun mas, algunos estudios han usado alguna base para neutralizar el pH (San y Onay, 2001; Warith, 2002) y así asegurar que los microorganismos metanogénicos se mantengan activos (Vlyssides y Karlis 2004).

Los microorganismos metanogénicos son considerados los más sensibles a la toxicidad de intermediarios que los demás presentes en la degradación anaerobia. La inhibición de la actividad microbiana por concentraciones elevadas de NH_3 , H_2S y ácidos grasos volátiles (ácido acético, propiónico y butírico) es dependiente del pH porque solo las formas no ionizadas son las que exhiben toxicidad microbiana. Cuando se estabiliza la concentración de ácido acético indica que existe un balance entre la tasa de consumo y producción del ácido, una baja concentración de ácido acético comparada con ácido propiónico indica una estabilidad en el funcionamiento del proceso. Por otro lado el NH_3 es inhibidor a pH mayor que 7, el H_2S y los AGV son tóxicos a pH menor a 7.

Cuando se produce metano a pH bajo se puede atribuir a microorganismos metanogénicos conocidos como hidrogenotróficos. La adaptación a condiciones ácidas es un fenómeno descrito por Hall *et al.*, en 1995 y que pudo explicar la resistencia de los microorganismos metanogénicos a dichas condiciones de acidez.

En un proceso de tratamiento anaeróbico de una sola etapa el pH debería mantenerse cercano a la neutralidad dado que las bacterias acidogénicas también trabajan a un pH

neutro y la etapa metanogénica requiere dicho pH para producir metano (Alvarez, 2001) y es frecuentemente la etapa limitante (Rittman, 2001).

1.3.3 Nutrientes

Una de las ventajas de los procesos de digestión anaerobia, frente a los procesos aerobios, es su baja necesidad de nutrientes derivada de los bajos índices de producción de biomasa que presentan los microorganismos anaerobios. Los principales nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos son el C, el N y el P, y una serie de elementos minerales como S, K, Na, Ca, Mg y Fe que deben de estar presentes a nivel de trazas. Diversos autores han estudiado la relación necesaria entre los nutrientes mayoritarios considerando una relación C:N entre 15-30:1 y C:P de 75-113:1 (Speece, 1987).

Para el caso de fangos de EDAR (Estación depuradora de aguas residuales), todos estos nutrientes suelen estar presentes en las cantidades requeridas.

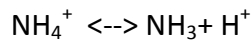
1.3.4 Inhibidores

El proceso de digestión anaerobia es inhibido por la presencia de tóxicos en el sistema. Estas sustancias pueden ser subproductos de la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios o pueden formar parte del influente. Experimentalmente se ha comprobado que la magnitud del efecto tóxico de una sustancia puede ser reducida significativamente por aclimatación de la población de microorganismos al tóxico. Por otra parte, muchas de estas sustancias a bajas concentraciones pueden ser estimuladoras del proceso.

Nitrógeno amoniacal

Durante el proceso anaerobio, el nitrógeno orgánico es hidrolizado dando lugar a formas amoniacales. Aunque el nitrógeno amoniacal es un nutriente importante para el crecimiento bacteriano, una concentración excesiva puede limitar su crecimiento.

El nitrógeno amoniacal es la suma del ion amonio (NH_4^+) y del amoniaco (NH_3). Ambas especies se encuentran en equilibrio químico, y la concentración relativa de cada una depende del pH, tal y como indica la ecuación de equilibrio:



De las dos especies, la que parece inhibir el proceso es el amoniaco libre ya que se ha comprobado experimentalmente que el efecto inhibitorio por amonio aumenta a pH alcalinos. Además del pH, la cantidad de amoniaco libre depende de la concentración del sustrato, de la relación C/N, de la capacidad del medio y de la temperatura de digestión. Obviamente, aquellos residuos que contengan mayores proporciones de proteínas u otros compuestos nitrogenados son los que presentan más problemas de inhibición por amonio.

Ácidos grasos volátiles (AGV)

La concentración de AGV, productos intermedios mayoritarios del proceso anaerobio, es uno de los parámetros que más eficazmente pueden indicar la evolución del proceso. De hecho, este parámetro es uno de los más utilizados en los sistemas de control debido a su rápida respuesta ante variaciones del sistema. Un ejemplo de ello, es la acumulación de ácidos grasos volátiles que tiene lugar en el sistema cuando la velocidad de degradación de estos, por parte de las bacterias responsables, disminuye por alguna causa adversa. Por tanto, un aumento en la concentración de ácidos volátiles en el sistema, siempre significa una desestabilización del proceso y, en consecuencia, una disminución de la producción de biogás.

Cationes y metales pesados

Los cationes de metales alcalinos y alcalino-térreos tienen un efecto estimulador de la actividad de las bacterias a bajas concentraciones. A partir de un nivel de concentración, pueden proporcionar toxicidad provocando una disminución de la velocidad de crecimiento.

La toxicidad de los cationes aumenta con el peso molecular, por lo que los metales pesados son los que provocan toxicidad a menor concentración. El orden de toxicidad de los metales pesados es Ni > Cu > Cr (IV) > Cr (III) > Pb > Zn.

Los niveles de inhibición varían mucho en función de varios factores. Si la introducción del catión en el reactor se produce de forma gradual, los microorganismos pueden aclimatarse y el efecto tóxico es menor. La presencia de sulfuros también disminuye la inhibición debido a la precipitación de estos con los metales pesados, pudiendo llegar a tolerarse elevadas concentraciones de metales pesados en estos casos.

Cuando se presentan combinaciones de estos cationes, el efecto que se produce es más complejo. Algunos actúan antagónicamente, reduciendo la toxicidad, y otros actúan sinérgicamente aumentándola.

En el caso de aguas residuales industriales las elevadas concentraciones de metales suelen ser la causa de la ineficacia del proceso anaerobio.

Sulfatos y sulfuros

La presencia de elevadas concentraciones de sulfato en el sustrato puede producir la inhibición del proceso anaerobio, especialmente de la metanogénesis. En presencia de sulfatos, las bacterias metanogénicas compiten con las sulfato-reductoras por los mismos sustratos (acetato e hidrógeno), mostrando estas últimas ventajas termodinámicas y cinéticas sobre las primeras. El resultado de esta competición determinará la proporción de sulfhídrico y metano en el biogás producido.

El sulfuro es también un inhibidor para muchos grupos bacterianos. En general, los metanogénicos son más sensibles que los acidogénicos y acetogénicos, comenzando a ser tóxico una concentración de 50 mg/l si los microorganismos metanogénicos no están aclimatados a los sulfuros. Parece que la forma tóxica es la no ionizada, por lo que la inhibición se favorece a pH bajos y a bajas temperaturas.

Por tanto, la inhibición tiene dos etapas, la primera debida a la competición por el sustrato entre los microorganismos metanogénicos y sulfato-reductores y la segunda es una inhibición directa del crecimiento metanogénico por la presencia de sulfuros solubles.

Otros inhibidores.

Debido a que la etapa de fermentación metánica tiene etapas realizadas por microorganismos estrictamente anaerobios, es obvio que el oxígeno es un tóxico más del proceso. Parece que concentraciones del orden de $1\mu\text{g/l}$ son inhibitorias.

También podemos señalar como inhibidores del proceso: determinadas sustancias orgánicas como ácidos grasos de cadena larga y alcoholes, en elevadas concentraciones, y la presencia de desinfectantes y antibióticos.

1.3.5 Agitación

La adecuada agitación del contenido del digestor es esencial para favorecer el proceso anaerobio. Los objetivos buscados con la agitación son: eliminación de los metabolitos producidos por las bacterias metanógenas, mezclado del sustrato fresco con la población bacteriana, evitar la formación de costra que se forma dentro del digestor, uniformar la densidad bacteriana y evitar la formación de espacios muertos sin actividad biológica.

En la selección del sistema, frecuencia e intensidad de la agitación se deberán realizar las siguientes consideraciones: El proceso fermentativo involucra un equilibrio simbiótico entre varios tipos de bacterias. La ruptura de ese equilibrio en el cual el metabolito de un grupo específico servirá de alimento para el siguiente implicará una merma en la actividad biológica y por ende una reducción en la producción de gas.

Como conclusión, en la elección de un determinado sistema se tendrá siempre presente tanto los objetivos buscados como el perjuicio que puede causar una agitación excesiva debiéndose buscar un punto medio óptimo.

Existen varios mecanismos de agitación utilizados desde los más simples, que consisten en un batido manual o el provocado por la entrada y salida de los líquidos, hasta sofisticados equipos que involucran agitadores a hélice, recirculadores de sustrato e inyectores de gas.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo desarrollar una metodología que pueda ser utilizada para determinar la Actividad Metanogénica Específica (AME) de un fango anaerobio. La determinación de la AME permite evaluar la actividad de la población de bacterias metanogénicas de un reactor anaerobio, es decir, la capacidad de dichos microorganismos de transformar el sustrato orgánico en metano y demás gases que forman parte del biogás. Concretamente, se pretende determinar la AME de las bacterias metanogénicas acetoclásticas del fango contenido en un reactor anaerobio de membranas que trata aguas residuales urbanas.

El equipo utilizado para cuantificar la producción del metano en los ensayos ha sido el sistema OxiTop®, así como un análisis cromatográfico del biogás generado.

En este trabajo se pretende estudiar las principales variables experimentales que influyen sobre la AME:

- Volumen de espacio de cabeza.
- Temperatura de incubación.
- Tipo y concentración de sustrato.
- Relación sustrato/inóculo.
- Concentración de tampón.
- Tipo de agitación.
- Conductividad.

Finalmente, para poder obtener un método estandarizado con el que poder comparar resultados, se han ajustado los resultados a un modelo teórico, concretamente al Ajuste de Gompertz.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Fango anaerobio.

El fango al que se le quiere determinar la AME utilizado en este trabajo es el fango contenido en un reactor anaerobio de membrana sumergida (SAMBR) que trata aguas residuales urbanas.

La planta piloto, situada en la EDAR del barranco del Carraixet, se ha operado a 2 temperaturas, 33 °C y 20 °C y a un tiempo de retención celular de 70 días.

3.2 Método experimental

3.2.1 Método de cuantificación del metano

Existen diferentes métodos para cuantificar el metano producido en el ensayo de AME, que se pueden clasificar en métodos manométricos o volumétricos.

Los métodos manométricos se basan en la medición de la presión ejercida sobre un sensor por el gas producido (biogás) que consiste principalmente en CH₄ y CO₂. Uno de los sistemas más utilizados es el equipo OxiTop®. Utilizando este equipo se puede realizar una absorción del CO₂ mediante la adición de lentejas de NaOH. De este modo, la variación en la presión dentro del sistema, será únicamente debida al metano contenido en el biogás. Para comprobar que se ha producido la absorción completa del CO₂ se requiere de un análisis cromatográfico del biogás.

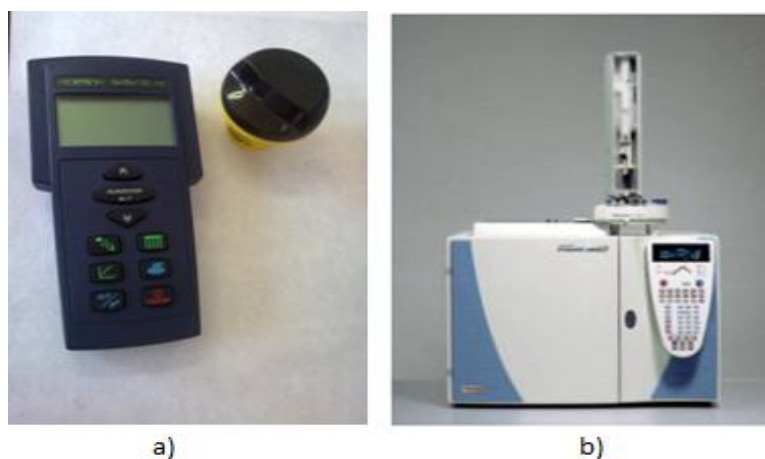


Figura 5. Método manométrico. a) Equipo OxiTop®. b) Cromatógrafo de gases.

Los métodos volumétricos se basan en la determinación del volumen de biogás o CH_4 que se produce en un matraz de reacción que contiene el medio cuya AME se pretende analizar. Existen dos formas de determinar la cantidad de CH_4 producido: i) la medición del volumen y la composición del biogás; ii) la medición directa del volumen de metano tras hacer circular el biogás a través de una solución alcalina que absorba el CO_2 .

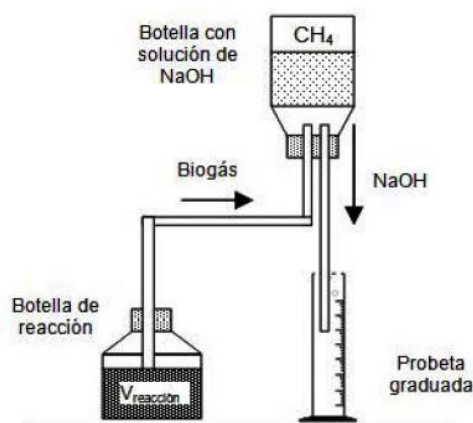


Figura 6. Esquema del montaje experimental del método volumétrico.

En este trabajo, se ha utilizado el método manométrico para cuantificar el CH_4 generado, puesto que se disponía de los equipos necesarios. Además, se ha realizado el análisis cromatográfico para comprobar que se ha producido una absorción total del CO_2 contenido en el biogás.

3.2.2 Montaje experimental

Una vez elegido el método de cuantificación del metano, se procedió a diseñar las diferentes baterías de experimentos. Para ello se utilizaron botellas de vidrio artesanales como la que se muestra en la siguiente figura.



Figura 7. Botella vacía utilizada en los ensayos AME.

Dichas botellas cuentan con dos orificios: En el orificio A se coloca el sensor de presión para poder conocer la presión ejercida por el metano, y con ella, cuantificar el volumen de metano a través de la ecuación de los gases ideales y el volumen del espacio de cabeza. En el orificio B se realizan las extracciones de biogás para evaluar su composición mediante análisis cromatográfico.

Para llevar a cabo el ensayo de AME se introduce en la botella el **inóculo** cuya AME se pretende conocer. El volumen de inóculo se calcula a partir del volumen total de reacción y la concentración de inóculo deseada. Resulta interesante conocer su concentración de Sólidos Volátiles (SV) con la finalidad de normalizar los resultados con respecto a dicho parámetro. Finalmente se mide la conductividad de la muestra puesto que será uno de los parámetros de estudio.

Para asegurarnos de que los microorganismos presentes en el inóculo disponen de todos los elementos necesarios para su crecimiento, se añade una solución de **nutrientes**, una

de **elementos traza**, una solución de **sulfuro** y extractos de **levadura** en la proporción en la que se muestra en la siguiente tabla.

	Compuesto	uds.	Cantidad
Macro-nutrientes	NH ₄ Cl	g/l	85
	KH ₂ PO ₄	g/l	18,5
	CaCl ₂	g/l	6
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/l	11,5
Elementos traza	FeCl ₃ ·6H ₂ O	mg/l	2307
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/l	2000
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/l	500
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	mg/l	30
	ZnCl ₂	mg/l	50
	H ₃ BO ₃	mg/l	50
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	mg/l	90
	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	mg/l	100
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	mg/l	50
	EDTA	mg/l	1000
	HCl 36%	ml/l	1
Sulfuros	Na ₂ S·9H ₂ O	g/l	100
Extractos de levadura		g/l	0,2

Tabla 4. Composición de la solución de nutrientes y elementos traza. Se añaden 2 ml de cada una de las disoluciones por litro de medio de ensayo. De extracto de levadura 0.2 g por litro de medio de ensayo. (Adaptado de Chernicharo, 2007 y Aquino *et al.*, 2007).

A continuación, hay que añadir el **tampón** para mantener el pH dentro del intervalo óptimo para el crecimiento de las bacterias metanogénicas (6.8-7.6, O’Flaherty *et al.*, 1999; Rittman y McCarty 2001). En este caso el tampón elegido ha sido fosfato bipotásico (K₂HPO₄) y fosfato monopotásico (KH₂PO₄). Los cálculos realizados para la determinación del tampón necesario se presentan en el apartado 3.3.2.

Posteriormente, se añade a la botella el **sustrato** necesario para el crecimiento de las bacterias metanogénicas. El sustrato utilizado en este trabajo es acetato de sodio. La concentración de sustrato es un parámetro cuya influencia sobre la AME se pretende estudiar. Se tomó la precaución de añadir el sustrato justo antes de cerrar la botella puesto que después de ser añadido empezará a haber actividad bacteriana y se pretende que toda actividad sea registrada por el equipo manométrico.

Resulta conveniente asegurar la ausencia de oxígeno en el espacio de cabeza, a fin de que su consumo no interfiera en el registro de la presión. Para ello se burbujea gas N_2 durante la preparación del experimento.

Justo después de añadir el acetato de sodio, se miden la temperatura y la conductividad de cada muestra, dado que nos resultarán de utilidad para realizar determinados cálculos y analizar los resultados. Posteriormente se cierra la botella. Para ello, se sellan los dos orificios, uno con un tapón roscado con septum de silicona por el cual se realizaran las extracciones de biogás para analizarlas en el cromatógrafo, y el otro con el cabezal del **OxiTop**[®]. El cabezal del OxiTop[®] va a registrar los incrementos de presión del gas que se va a ir acumulando en el espacio de cabeza, por tanto, antes de cerrar se coloca un tapón de caucho con unas lentejas de sosa para que absorban el CO_2 y así se asegura que la presión registrada por el OxiTop[®] corresponderá únicamente al metano producido.



Figura 8. Esquema montaje experimental de la botella en el ensayo de la AME.

Por último, con el mando del equipo del OxiTop[®] se activan los cabezales para que empiecen a registrar los incrementos de presión, y se dejan las botellas incubando a la temperatura deseada. Cada vez que se quiera conocer la presión que está siendo registrada en ese instante, se agita suavemente y de forma manual la botella para favorecer la salida del gas de la fase diluida hacia el espacio de cabeza y así también pueda ser registrado.

Cabe destacar también, que el mismo procedimiento se realiza para el ensayo de los blancos experimentales con los que se pretende conocer la AME debida al sustrato que pueda quedar en el fango, por lo que se sigue el mismo procedimiento pero con la diferencia de que a estos no se les añade ningún sustrato.

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Determinación de sólidos totales y volátiles.

Las concentraciones de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) del inóculo se han determinado de acuerdo con los métodos 2540D y E, respectivamente del Standard methods of examination of water and wastewater (APHA, 2005).

Los sólidos totales se han calculado mediante la diferencia entre el peso del residuo seco, secado a 105 °C en estufa durante 12 horas, y la cápsula antes del análisis.

$$ST \left(\frac{mg}{l} \right) = \frac{(A-B)*1000}{Volumen\ de\ muestra, en\ ml} \quad (ecu. 1)$$

Donde

A es el peso del residuo seco mas el crisol, en mg.

B es la tara del crisol, en mg.

Por otro lado, la determinación de los sólidos volátiles se lleva a cabo sobre la misma muestra calculando la pérdida de peso que experimenta la muestra seca al ser calcinada en una mufla a 550 °C.

$$SV \left(\frac{mg}{l} \right) = \frac{(A-C)*1000}{Volumen\ de\ muestra, en\ ml} \quad (ecu. 2)$$

Donde

A es el peso del residuo seco más el crisol antes de la calcinación, en mg.

C es el peso del residuo mas el peso del crisol después de la calcinación a 550 °C, en mg.



Figura 9. Determinación de ST y SV.

a) Proceso de secado a 105 °C para la determinación de sólidos totales.

b) Proceso de calcinación a 550 °C para la determinación de sólidos volátiles.

3.3.2 Determinación de la concentración de tampón.

En los organismos vivos se están produciendo continuamente ácidos orgánicos que son productos finales de reacciones metabólicas, catabolismo de proteínas y otras moléculas biológicamente activas. Mantener el pH en los fluidos intra y extracelulares es fundamental puesto que ello influye en la actividad biológica.

La manera en que podemos regular el pH dentro de los límites compatibles con la vida son: 1) los tampones fisiológicos y 2) la eliminación de ácidos y bases por compensación respiratoria y renal.

En este trabajo se ha utilizado un tampón de fosfato, concretamente fosfato bipotásico (K_2HPO_4) y fosfato monopotásico (KH_2PO_4).

A continuación se muestran los cálculos realizados para conocer la concentración de partida a añadir del tampón para mantener un pH de aproximadamente 7, basándonos en la Ecuación de Henderson-Hasselbalch, la cual permite calcular el pH de una mezcla amortiguadora conociendo su composición.

$$pH = pka + \log \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]} \quad (ecu. 3)$$

Siendo el pka del fosfato 6.86 según la bibliografía (K. M. DeAngelis, 2007).

$$7 = 6.86 + \log \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]} \quad (ecu. 4)$$

$$0.14 = \log \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]} \quad (ecu. 5)$$

$$\frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]} = \text{antilog } 0.14 \quad (ecu. 6)$$

$$[K_2HPO_4] = 1.38 [KH_2PO_4] \quad (ecu. 7)$$

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son intermediarios en el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica, con lo que si el proceso funciona correctamente, su concentración no será muy elevada, por lo que la capacidad tamponante necesaria será baja. Por tanto, siendo la molaridad de la disolución del tampón fosfato de $M = 0.01$, el peso molecular (PM) del K_2HPO_4 de 174.18 g/mol, y el de KH_2PO_4 de 136.09 g/mol, y los volúmenes de muestra de 300 ml:

$$\frac{0.01 \text{ mol}}{1 \text{ l disol.}} * \frac{136.09 \text{ g}}{1 \text{ mol } KH_2PO_4} * 300 \text{ ml} = 0.408 \text{ g} \quad (ecu. 8)$$

$$\frac{0.0138 \text{ mol}}{1 \text{ l disol.}} * \frac{174.68 \text{ g}}{1 \text{ mol K}_2\text{HPO}_4} * 300 \text{ ml} = 0.723 \text{ g} \quad (\text{ecu. 9})$$

Por tanto, las concentraciones de tampón con las que se inician los ensayos son las siguientes:

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0.408 \text{ g}/0.3\text{l}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.723 \text{ g}/0.3\text{l}$$

3.3.3 Determinación del pH

Para controlar el pH de las muestras y asegurarnos que se está trabajando bajo las condiciones de pH requeridas para obtener los mejores resultados de la AME se ha utilizado un pH-metro, con el cual se consiguen medidas exactas del valor del pH de cada una de las muestras.

3.3.4 Determinación de la temperatura

La temperatura de las muestras se ha medido antes de cerrar cada botella con la ayuda de un termómetro de laboratorio.



Figura 10. Termómetro de laboratorio.

3.3.5 Determinación de la conductividad y salinidad.

Al determinar la conductividad se evalúa la capacidad del agua para conducir la corriente eléctrica, es una medida indirecta de la cantidad de iones en solución (fundamentalmente cloruro, nitrato, sulfato, fosfato, sodio, magnesio y calcio).

La unidad básica para medir la conductividad es el siemens por centímetro. El agua destilada tiene una conductividad en el rango de 0,5 a 3 μ Siemens/cm.

La conductividad va a ser determinada mediante la utilización de un conductímetro electrónico (Figura 11) que genera una diferencia de voltaje entre dos electrodos sumergidos en agua. La caída en el voltaje debida a la resistencia del agua es utilizada para calcular la conductividad.



Figura 11. Conductímetro de laboratorio.

Los valores de conductividad han sido medidos en la muestra del fango tanto antes de añadirle los nutrientes, tampón y sustrato, como después, para comprobar cómo variaba y poder estudiar su influencia sobre la AME.

Por otro lado, aparte de medir la conductividad se ha calculado la salinidad aportada a la mezcla puesto que al añadirle el acetato de sodio y el tampón fosfato se están

añadiendo iones Na^+ y K^+ respectivamente, y para conocer su influencia sobre la AME es necesario conocer la cantidad exacta de iones que se están añadiendo al lodo.

Los cálculos realizados para conocer las concentraciones de iones añadidas son los siguientes:

$$[\text{K}^+] = [\text{KH}_2\text{PO}_4] * V_F * \frac{\text{PA}(\text{K}^+)}{\text{PM}(\text{KH}_2\text{PO}_4)} + 2 * [\text{K}_2\text{HPO}_4] * V_F * \frac{\text{PA}(\text{K}^+)}{\text{PM}(\text{K}_2\text{HPO}_4)} \quad (\text{ecu. 10})$$

$$[\text{Na}^+] = [\text{CH}_3\text{COONa}] * \frac{\text{PA}(\text{Na}^+)}{\text{PM}(\text{CH}_3\text{COONa})} \quad (\text{ecu. 11})$$

Donde

PA es el peso atómico del elemento. PA (K^+) es 39.1, PA (Na^+) es 23.

PM es el peso molecular del compuesto. PM (KH_2PO_4) es 136.09. PM (K_2HPO_4) es 174.18. PM (CH_3COONa) es 136.08.

Por tanto, la salinidad que se está aportando a la mezcla al añadir el sustrato y el tampón es:

$$\text{Salinidad} = [\text{K}^+] + [\text{Na}^+]$$

3.3.6 Determinación del contenido de CH_4 en el biogás.

La producción de metano se ha determinado según el método manométrico que se ha explicado anteriormente en el apartado 3.2.1, y posteriormente se han ajustado los datos experimentales a la ecuación tipo Gompertz (R. Le Hyariz et al., 2010) para determinar la velocidad de producción de metano teórica esperada. En el apartado 3.3.7 se comparan los resultados obtenidos experimental y teóricamente de la AME.

Por último, con el fin de comprobar que se había absorbido todo el CO₂ y que por tanto, todo el incremento de presión era debido únicamente al metano producido, se han analizado las muestras de biogás en el cromatógrafo.

A continuación se explican los cálculos realizados para estas determinaciones.

3.3.6.1 Volumen de CH₄ experimental.

La producción de metano debe ser calculada teniendo en cuenta las condiciones de temperatura y presión atmosférica bajo las cuales se realicen los experimentos.

Considerando la ecuación de combustión de metano, teniendo una oxidación completa de éste, un mol de CH₄ consume dos moles de O₂. Por tanto, a condiciones normales de temperatura y presión (T=273 °K; P=1 atm), 22.4 litros de metano corresponden a 64 g de DQO. Esta relación permite estimar la fracción de materia orgánica convertida en metano a partir del volumen de metano producido en el reactor, por unidad de tiempo. Como esta relación es válida para condiciones normales de temperatura y presión, para cualquier otra condición, este volumen debe ser corregido. De este modo podemos estimar la cantidad de CH₄ que teóricamente se va a generar a partir de una concentración de sustrato inicial conocida.

Debido a todo esto, mediante la ecuación de los gases ideales primero se ha calculado el número de moles de CH₄ generados de metano a las condiciones de ensayo, y después se ha corregido para obtener el valor en condiciones normales.

Ley de los gases ideales $P \cdot V = n R T$

Por tanto, y suponiendo que todo el CO₂ ha sido absorbido en la sosa, el número de moles generados a la presión y temperatura de ensayo se ha calculado de la siguiente manera:

$$n_{generado}^{CH_4} = \frac{P \cdot V^{EC}}{R \cdot T} \quad (ecu. 12)$$

Donde

P es el incremento de la presión registrada por el OxiTop® en atm.

V^{EC} es el volumen del espacio de cabeza en litros.

R la constante de los gases ideales en atm · L · K⁻¹ · mol⁻¹

T la temperatura de ensayo en °K.

Conocidos el número de moles de metano generado se pueden conocer los litros de metano generado.

$$V_{generado}^{CH_4} (ml) = \frac{n_{generado}^{CH_4} \cdot R \cdot T}{P} \quad (ecu. 13)$$

Donde

P es la presión registrada por el OxiTop® en atm.

n_{generado}^{CH₄} son los moles de metano generados.

R la constante de los gases ideales en atm · L · K⁻¹ · mol⁻¹

T la temperatura de ensayo en °K.

Tras conocer el volumen de metano generado, ya podemos saber el volumen total que tenemos si al volumen generado le sumamos el volumen total de metano que había justo al inicio del ensayo, es decir, el que hay a tiempo cero. Este volumen inicial, se corresponde con el volumen de metano presente en el espacio de cabeza a tiempo cero $V_{EC}^{CH_4}$, y se calcula mediante la ecuación de la Ley de Henry y aplicando balances de materia.

$$V_{Total}^{CH_4} (ml) = V_{generado}^{CH_4} + V_{Total\ inicial}^{CH_4} \quad (ecu. 14)$$

En los primeros ensayos realizados, se comprobó como el volumen inicial era siempre cero, por lo que se asumió para el resto de ensayos un valor inicial de metano de cero para simplificar los cálculos.

Una vez conocido el volumen total de metano podemos calcular el número de moles totales de metano volviendo a aplicar la ley de los gases ideales, y con el volumen del espacio de cabeza lo que calculamos es el número de moles totales de biogás. Por último, se calcula el porcentaje de metano a partir de la fracción molar de metano en el espacio de cabeza.

$$n_{total}^{CH_4} = \frac{P \cdot V_{Total}^{CH_4}}{R \cdot T} \qquad n_{total} = \frac{P \cdot V^{EC}}{R \cdot T} \quad (ecu. 15-ecu. 16)$$

$$\% CH_4 \text{ biogás} = \frac{n_{CH_4}}{n_{biogás}} \quad (ecu. 17)$$

Como se ha comentado anteriormente hay que transformar las unidades a condiciones normales de presión y temperatura puesto que después lo vamos a comparar con la producción teórica de metano y esta es siempre calculada en condiciones normales.

$$V_{generado}^{CH_4} \text{ en CN (ml)} = \frac{n_{generado}^{CH_4} \cdot R \cdot T}{P} \quad (ecu. 18)$$

Donde

P es la presión de 1 atm.

$n_{generado}^{CH_4}$ son los moles de metano generados.

R la constante de los gases ideales en $\text{atm} \cdot \text{L} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T la temperatura de 273°K.

El valor de metano contabilizado hasta el momento no es realmente la cantidad total de metano puesto que hasta ahora los cálculos realizados solo dan el valor de la cantidad de metano presente en la fase gas, por lo que faltaría calcular la cantidad de metano que puede estar disuelto, que aunque a priori debe ser muy inferior, es necesario para tener un cálculo mas real de la cantidad total de metano.

Por tanto, para conocer el metano disuelto lo primero es calcular la fracción molar que hay en el líquido y para ello hay que aplicar la Ley de Henry.

$$X_{Disuelto}^{CH_4} = \frac{P \cdot \frac{\%CH_4}{100}}{H_F^{CH_4}} \quad (ecu. 19)$$

Donde

P es la presión del gas registrada por el OxiTop® en atm.

$H_F^{CH_4}$ es la constante de Henry del metano final en atm.

$$H_F^{CH_4} = \log_{10} \frac{-675.74}{T+273^{\circ}K} + 6.88$$

Conocida por tanto la fracción molar del metano en el líquido, podemos calcular la concentración molar con la que podremos calcular el número de moles de metano disueltos.

$$M_{Disuelto}^{CH_4} \left(\frac{mol}{l} \right) = \frac{M^{H_2O} * X_{Disuelto}^{CH_4}}{1 - X_{Disuelto}^{CH_4}} \quad (ecu. 20)$$

$$n_{Disuelto}^{CH_4} (mol) = M_{Disuelto}^{CH_4} * V^{Muestra} \quad (ecu. 21)$$

Como se había comentado anteriormente, se necesita conocer el volumen de metano en condiciones normales para poder comparar el valor experimental con el valor de metano

teórico, por lo que también se ha pasado el volumen de metano disuelto a condiciones normales.

$$V_{Disuelto}^{CH_4} \text{ en CN (ml)} = \frac{n_{Disuelto}^{CH_4} \cdot R \cdot T}{P} \quad (\text{ecu. 22})$$

Donde

P es la presión de 1 atm.

$n_{Disuelto}^{CH_4}$ son los moles de metano disueltos en el líquido.

R la constante de los gases ideales en $\text{atm} \cdot \text{L} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T la temperatura de 273°K.

Por tanto, el volumen total de metano es la suma del metano generado presente en la fase gas y del metano disuelto.

$$V_{T_{experimental}}^{CH_4} \text{ (ml)} = V_{generado}^{CH_4} \text{ (ml) en CN} + V_{Disuelto}^{CH_4} \text{ (ml) en CN} \quad (\text{ecu. 23})$$

3.3.6.2 Volumen de CH4 teórico.

Como se ha comentado anteriormente, se determina el volumen de CH₄ teórico que se debería conseguir con las condiciones de cada ensayo para determinar los parámetros característicos de actividad del fango.

Basado en los datos experimentales de acumulación del metano de cada experimento de AME realizado, se ha ajustado mediante el modelo de Gompertz, al que se ha introducido un factor λ para tener en cuenta el retardo en el comienzo de la producción de biogás, para estimar la tasa máxima de producción de metano.

$$V_{CH_4}(t) = P_{MAX} * \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{MAX} * e}{P_{MAX}} * (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{ecu. 24})$$

Donde

$V_{CH_4}(t)$ es la producción acumulada de metano en ml/h.

P_{MAX} es la máxima producción acumulativa de metano al final del periodo de experimentación en ml.

R_{MAX} es la máxima velocidad de producción de metano en ml/h.

λ es la fase de retardo en h^{-1} .

Para calcular los valores óptimos de P_{MAX} , R_{MAX} y λ se ha utilizado la herramienta SOLVER de la hoja de cálculo Excel para minimizar la suma de la diferencia de cuadrados entre los datos experimentales y los teóricos.

3.3.6.3 Volumen de CH₄ del cromatógrafo.

Como se ha comentado, se miden también las muestras de biogás de los ensayos en el cromatógrafo para confirmar que todo el CO₂ ha sido absorbido por la sosa y los cálculos realizados son, por tanto, correctos.

Para este cálculo lo que se hace es inyectar una muestra de biogás en el cromatógrafo y otra muestra de un patrón conocido al 99% de metano, y los cálculos realizados son los siguientes:

$$\% CH_4 = \frac{\text{Valor medido de } CH_4 \text{ en el cromatógrafo}}{\text{Valor medido del patrón}} * 100 \quad (\text{ecu. 25})$$

Una vez obtenido este valor se corrige con la presión, puesto que el volumen inyectado estará a la presión de la botella, mientras que el patrón se encuentra a presión atmosférica.

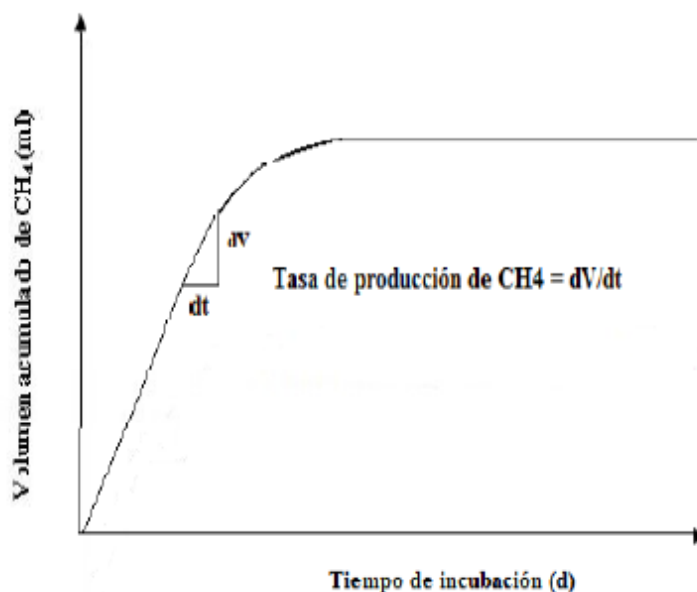
$$\% CH_4 \text{ corregido} = \frac{\% CH_4}{1 \text{ atm} + P (\text{atm})} \quad (\text{ecu. 26})$$

Donde

P (atm) es la presión registrada por el OxiTop®.

3.3.7 Determinación de la AME.

Una vez explicada la metodología de cálculo para conocer la producción de metano, la AME puede calcularse a partir de los valores experimentales o a partir del valor máximo ajustado mediante la ecuación de Gompertz (R_{MAX}). Para calcularla a partir de los datos experimentales se tiene en cuenta la pendiente máxima (m) en la curva de producción de metano (volumen acumulado de CH_4 vs tiempo). La pendiente debe ser tomada en el tramo de mayor inclinación de la curva.



$$AME_{experimental} \text{ (ml } CH_4/\text{g SSV} \cdot \text{d)} = \frac{m}{I * V_{Tmuestra}} \quad (\text{ecu. 27})$$

Donde

m es la pendiente máxima de la curva de producción de metano.

I es la concentración de inóculo en g SSV/l.

$V_{T_{muestra}}$ es el volumen total de muestra en la botella.

$$AME_{experimental} \text{ (mg DQO/g SSV} \cdot \text{d)} = \frac{1000 \text{ml} \cdot \text{ml CH}_4 \text{/g SSV} \cdot \text{d}}{\frac{1000/f}{2} \cdot R \cdot T} \quad (\text{ecu. 28})$$

Donde

R es la constante de los gases ideales en atm · L · K⁻¹ · mol⁻¹

T es la temperatura ensayo en K⁻¹.

f es el factor de conversión de volumen de metano a g de DQO.

Por último, para calcular la AME a partir de los resultados teóricos simulados se divide la tasa de producción máxima de metano (R_{MAX}) por la cantidad de sólidos volátiles presentes en cada botella.

$$AME_{teórica} \text{ (ml CH}_4 \text{/g SSV} \cdot \text{d)} = \frac{R_{MAX} \cdot 24 \text{h}}{I \cdot V_{T_{muestra}}} \quad (\text{ecu. 29})$$

Donde

R_{MAX} es la tasa máxima de producción de metano en ml/h.

I es la concentración de inóculo en g SSV/l.

$V_{T_{muestra}}$ es el volumen total de muestra en la botella.

$$AME_{teórica} \text{ (mg DQO/g SSV} \cdot \text{d)} = \frac{1000 \text{ ml} \cdot \text{ml } CH_4 / \text{g SSV} \cdot \text{d}}{\frac{1000 / f}{2} \cdot R \cdot T} \quad (\text{ecu. 30})$$

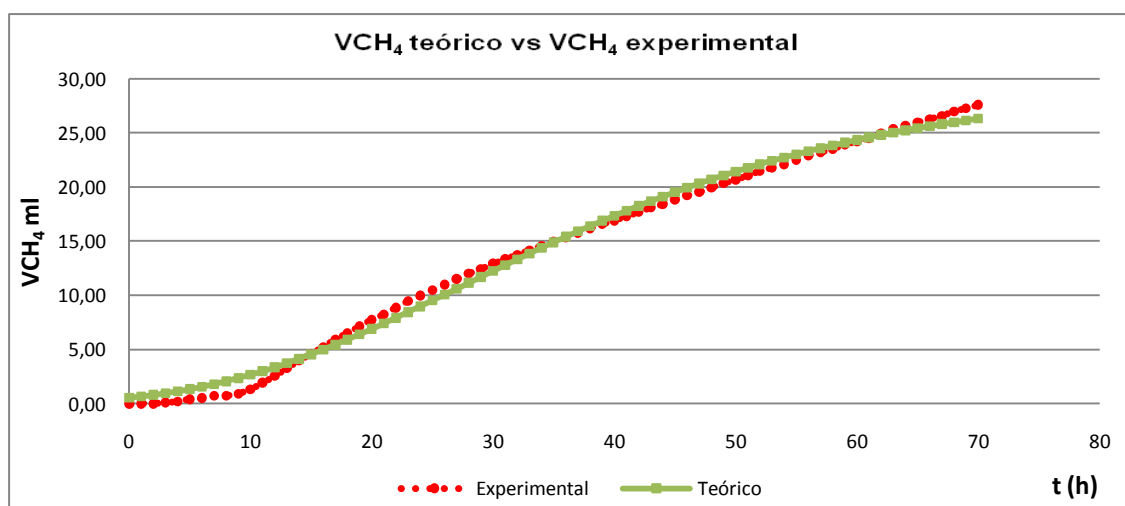
Donde

R es la constante de los gases ideales en $\text{atm} \cdot \text{L} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T es la temperatura ensayo en K^{-1} .

f es el factor de conversión de volumen de metano a g de DQO.

Una vez realizados todos los cálculos para conocer la AME tanto a partir de los datos experimentales como a partir de los valores teóricos que se han ajustado mediante la ecuación de Gompertz, se comprobó que los resultados obtenidos eran similares, lo que sirvió para corroborar que el ajuste de los datos experimentales a la ecuación tipo Gompertz era bastante bueno. En los siguientes gráficos se muestran las rectas correspondientes a los valores teóricos y experimentales de varios de los ensayos realizados en los que se observa como ambos valores son prácticamente idénticos.



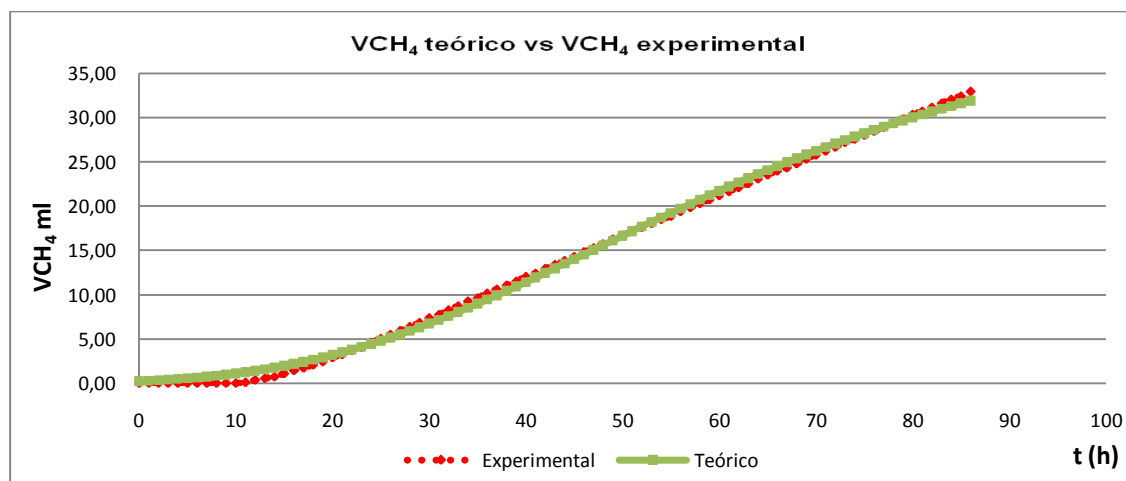
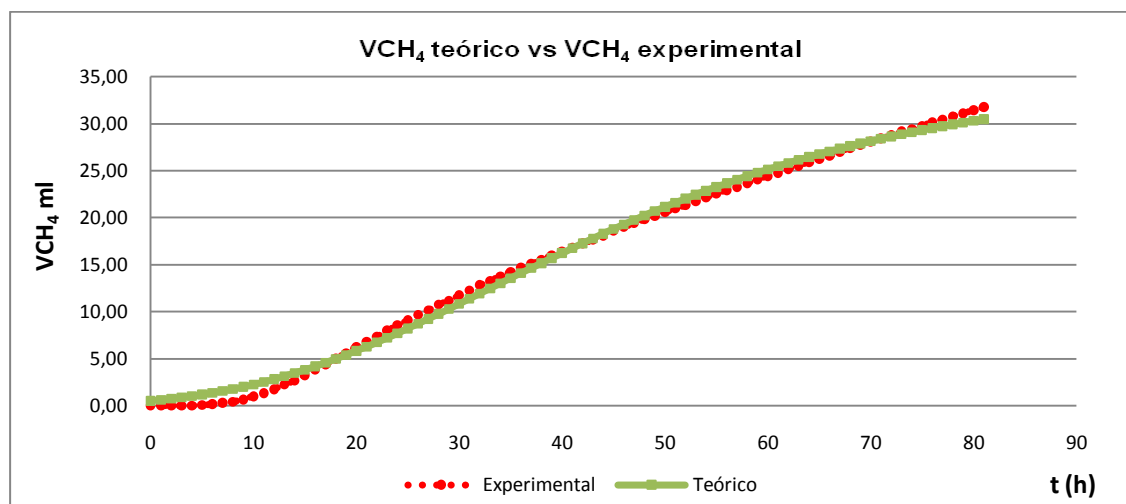


Gráfico 1. Comparación entre valores de metano teóricos esperados y valores experimentales de tres muestras de ensayos diferentes.

Tras observar el Gráfico 1 se puede apreciar como los resultados experimentales obtenidos son prácticamente idénticos a los resultados obtenidos mediante el ajuste teórico, por lo que los cálculos de la AME para obtener los resultados de este trabajo fueron realizados mediante el ajuste teórico para poder conseguir un método más estandarizado y que se pueda aplicar en todo tipo de condiciones.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1 *Análisis cromatográfico del biogás.*

El análisis cromatográfico del biogás generado demostró su eficacia puesto que ninguna de las muestras analizadas en el cromatógrafo detectó la presencia de CO_2 , como se puede observar en el siguiente gráfico correspondiente al análisis cromatográfico del biogás de una de las muestras.

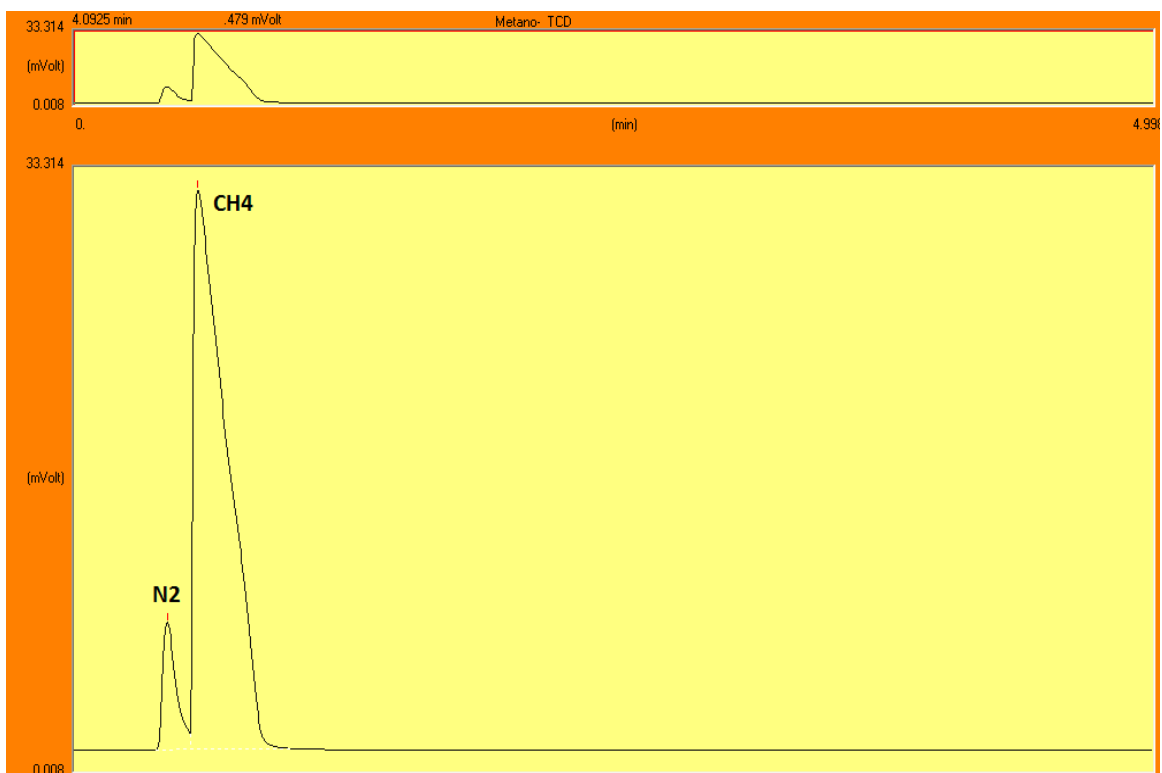


Gráfico 2. Análisis cromatográfico de una muestra de biogás.

En el gráfico, el primer pico se corresponde con la presencia de N_2 , el cual está presente en pequeña cantidad debido al burbujeo de las muestras con este gas para desplazar el O_2 y generar así la condición anaerobia necesaria. El segundo pico que aparece es el que se corresponde con la presencia de CH_4 , y por tanto, como se observa, nunca llega a detectarse CO_2 .

A parte de comprobar la ausencia de CO₂, se utilizó el cromatógrafo para comprobar que el volumen de CH₄ obtenido era realmente el que se había cuantificado a partir de las presiones.

A continuación se detallan los resultados obtenidos del estudio de las variables experimentales de mayor influencia en la AME.

4.2 Influencia del volumen del espacio de cabeza

El volumen de fase gaseosa puede tener una gran influencia en las pruebas manométricas debido al estrecho margen de la presión de funcionamiento del equipo utilizado. De esta manera, el ensayo para la determinación de la AME debe estar precedido por un estudio de la máxima cantidad de biogás producido para la adecuación del volumen del espacio de cabeza. En este experimento fue difícil hacer pruebas con espacios de cabeza exactamente iguales para poder estudiar su influencia, debido a que las botellas utilizadas son artesanales, por lo que aunque se monten dos botellas con idénticas condiciones de incubación y sustrato, los volúmenes del espacio de cabeza nunca pueden ser idénticos.

Inicialmente, se planificaron pruebas con el mínimo espacio de cabeza posibilitando así la presencia de un mayor volumen de inóculo, lo cual hace que al haber una mayor cantidad de fango los resultados obtenidos sean más representativos, consiguiendo además una mayor producción de CH₄.

Sin embargo, para minimizar el espacio de cabeza había que tener en cuenta el valor límite del OxiTop®, puesto que el hecho de dejar muy poco espacio de cabeza provoca que las presiones sean más elevadas con el peligro de sobrepasar el valor límite de 350 hPa que llega a medir el OxiTop®.

Por todo esto, se decidió realizar los ensayos con un volumen total de 300 ml porque las botellas tienen unos volúmenes entre 380 y 430 ml aproximadamente, así que la media del

volumen del espacio de cabeza era de 100 ml. Con este volumen de espacio de cabeza fue posible el ensayo sin que las presiones detectadas sobrepasaran el umbral del equipo, maximizando así la cantidad de inóculo en las botellas.

Los ensayos realizados para estudiar la influencia del volumen del espacio de cabeza (V_{EC}) se muestran en la Tabla 5. Se estudiaron dos muestras con diferente volumen de espacio de cabeza (M1 y M3), y sus dos blancos (M2 y M4). Para que el único factor que influyera fuera el espacio de cabeza, se plantearon condiciones idénticas de concentración de sustrato ([S]), concentración de inóculo ([I]) y por tanto de relación S/I entre las muestras y también entre los blancos.

Muestra	Tª °C	V _{EC} ml	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	S/I g/l
M1	35	99	300	200	2,25	11,23	0,200
M2	35	96	300	200	0,00	11,23	0,000
M3	35	180	200	150	2,25	9,33	0,241
M4	35	170	200	150	0,00	9,33	0,000

Tabla 5. Características de los ensayos para el estudio de la influencia del espacio de cabeza.

La diferencia de presiones alcanzadas dependiendo del mayor o menor espacio de cabeza se pueden observar en el Gráfico 3. Se aprecia como las botellas con menor espacio de cabeza y por tanto mayor concentración de fango, alcanzan unos mayores incrementos de presión, lo cual se va a traducir en mayores cantidades de CH₄ producido.

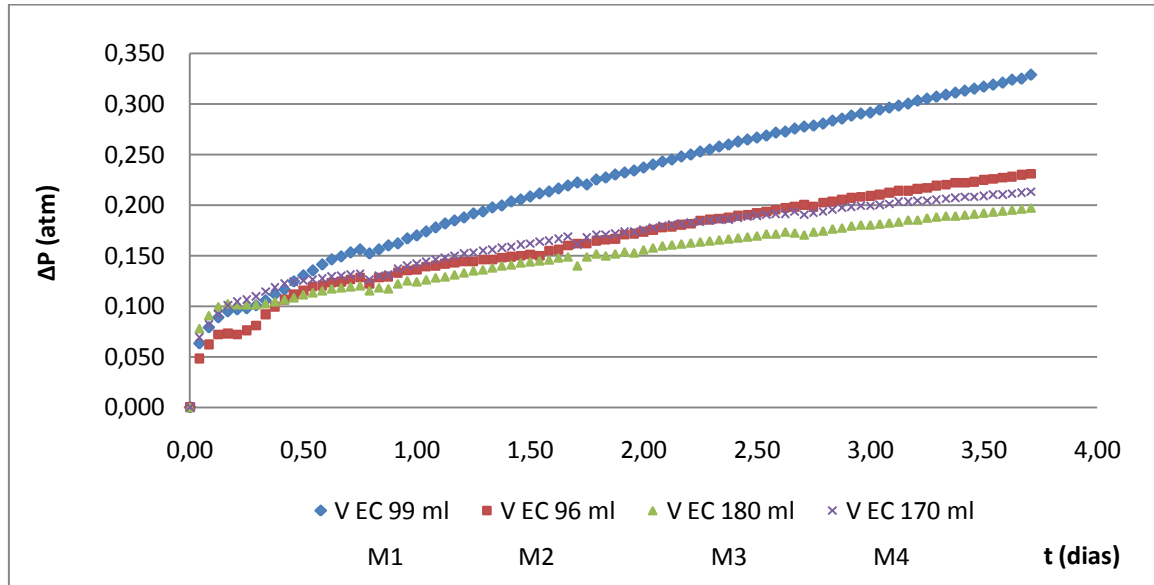


Gráfico 3. Influencia del volumen de espacio de cabeza en el incremento de presión.

Como se observa en el gráfico, las botellas con menor espacio de cabeza, es decir, las de volumen total de 300 ml, presentan unas mayores presiones, lo cual se traduce en mayores cantidades de CH₄ producido.

Los valores de la tasa máxima de producción de CH₄ (R_{MAX}) del ajuste de Gompertz, explicado en el apartado 3.3.6.2 necesario para poder calcular el valor de la AME aparecen en la siguiente tabla.

Muestra	R _{MAX} (Ajuste Gompertz) (ml CH ₄ /h)
M1	0,399
M2	0,336
M3	0,195
M4	0,189

Tabla 6. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia del espacio de cabeza.

El Gráfico 4 muestra una comparación de la AME para cada muestra, probando como un menor volumen de espacio de cabeza produce mayores valores de AME, y a su vez consigue que la muestra sea más representativa reduciendo así el error experimental.

Resultados similares se han obtenido en otros ensayos encontrados en la bibliografía (Souto *et. al.*, 2010).

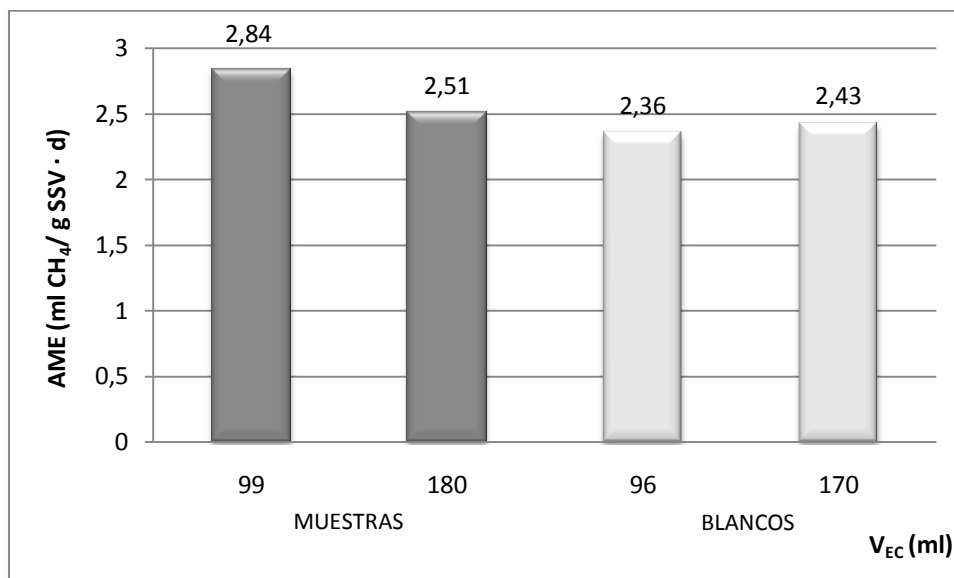


Gráfico 4. Influencia del volumen del espacio de cabeza en la AME.

Para comprobar los resultados obtenidos, se compararon los porcentajes de CH₄ en el biogás calculados a partir de los datos experimentales, con el valor medido en el análisis cromatográfico de la muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

	MUESTRA			
	M1	M2	M3	M4
% CH ₄ Experimental	17,38	9,79	7,42	7,32
% CH ₄ cromatografía	17,72	10,95	8,50	8,66

Tabla 7. Comparación de los porcentajes de CH₄ en los ensayos de la influencia del espacio de cabeza.

Con esta tabla se puede observar como los porcentajes de CH₄ obtenidos fueron similares por las dos vías, por lo que se comprueba el buen desarrollo del experimento realizado y por tanto la veracidad de los resultados obtenidos.

4.3 Influencia de la temperatura de incubación

Para estudiar la influencia sobre la AME de la temperatura de incubación, los experimentos llevados a cabo fueron a 2 temperaturas diferentes, una de ellas a 35°C, temperatura a la cual trabajaba la planta piloto al inicio de los ensayos, y otra a 20°C, temperatura a la que trabajaba en los últimos ensayos realizados.

A continuación se muestra la Tabla 8 con las características de cada una de las botellas montadas para el estudio de la influencia de la temperatura de incubación. Se hicieron réplicas con dos concentraciones de sustrato diferentes e igual concentración de inóculo y sus blancos para las temperaturas de 35 y 20°C.

Muestra	T	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	S/I g/l
M1	35°C	300	150	0,50	6,74	0,074
M2		300	150	1,00	6,74	0,148
M3		300	150	Blanco	6,74	Blanco
M4	20°C	300	150	0,50	6,74	0,074
M5		300	150	1,00	6,74	0,148
M6		300	150	Blanco	6,74	Blanco

Tabla 8. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la temperatura de incubación.

Lo primero que se comprobó con este ensayo fue la diferencia en cuanto a los periodos de latencia entre las dos temperaturas estudiadas. Como se observa en el Gráfico 5 para una temperatura de 35 °C la producción de CH₄ se inicia a las pocas horas de comenzar el ensayo y va aumentando rápidamente, mientras que a 20 °C el periodo de latencia es mayor, por lo que la producción de CH₄ se inicia más tarde y es más lenta, no llegando nunca a alcanzar la producción de CH₄ que tiene lugar a temperaturas más elevadas.

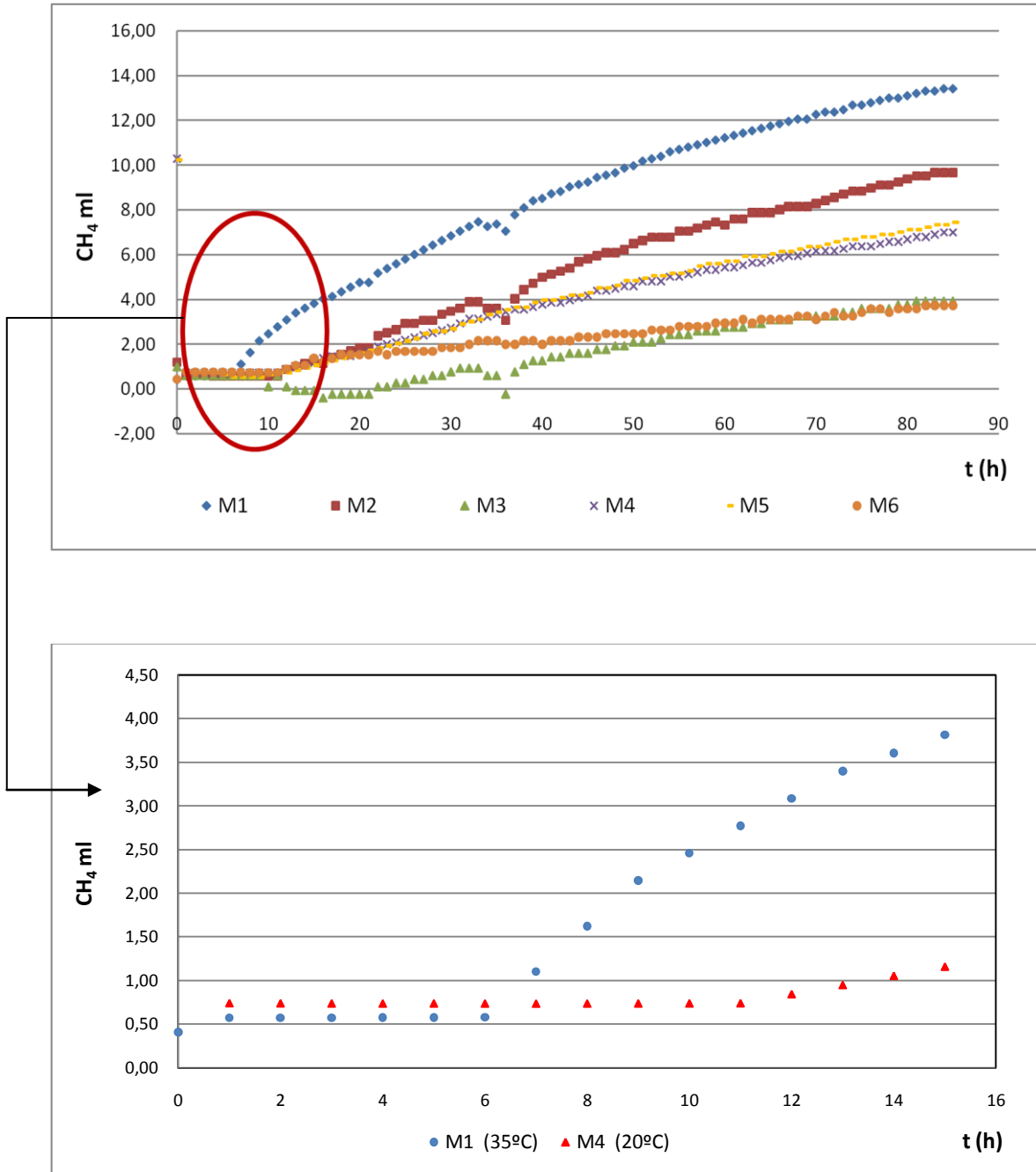


Gráfico 5. Influencia de la temperatura de incubación en el periodo de latencia y en la producción máxima de CH_4 de las bacterias.

En la siguiente tabla se muestran los valores de la R_{MAX} del ajuste de Gompertz para este ensayo.

Muestra	R _{MAX} (Ajuste Gompertz) (ml CH ₄ /h)
M1	0,22
M2	0,15
M3	0,08
M4	0,09
M5	0,10
M6	0,05

Tabla 9. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la temperatura de incubación.

Los valores de AME alcanzados se muestran en el Gráfico 6. Tal y como se observa, los valores de la AME fueron mayores para las muestras incubadas a 35 °C observándose como incluso la muestra 1 (S/I= 0.074 y 35 °C) presenta una AME del doble que la muestra 4 (S/I= 0.074 y 20 °C). Lo mismo ocurre entre las muestras 2 y 4 y entre los dos blancos. Por tanto, se observa como el valor de la AME es mayor cuanto mayor es la temperatura de incubación, tal y como se esperaba.

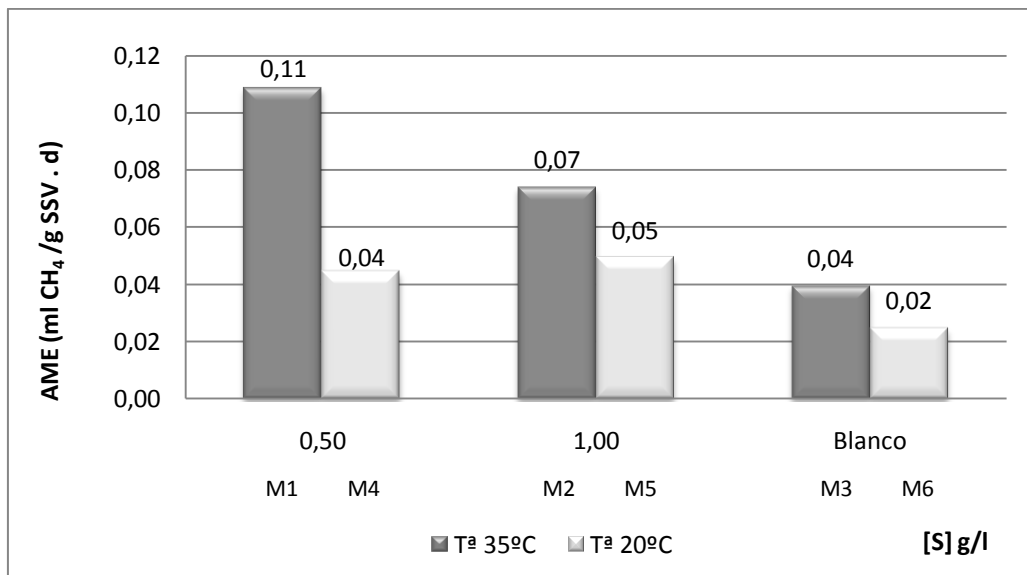


Gráfico 6. Influencia de la temperatura de incubación en la AME.

Aunque los mejores resultados en cuanto a los valores de AME se obtuvieron para la temperatura de 35 °C, a partir de este momento todos los ensayos siguientes se llevaron a cabo a 20 °C debido a que era la temperatura a la que estaba trabajando la planta, y por tanto es a esa temperatura a la cual queremos conocer el valor de la AME del fango anaerobio.

En la Tabla 10 se muestran los porcentajes de CH₄ obtenidos mediante las dos vías diferentes. Al igual que para los anteriores experimentos, los resultados obtenidos son correctos puesto que los valores del porcentaje de CH₄ en el biogás fueron similares.

	MUESTRA					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
% CH ₄ Experimental	17,72	13,74	9,59	13,05	13,22	9,49
% CH ₄ cromatografía	17,69	14,74	9,88	12,02	12,51	8,11

Tabla 10. Comparación de los porcentajes de CH₄ en los ensayos de la influencia de la temperatura de incubación.

4.4 Influencia del sustrato

4.4.1 Tipo de sustrato

El sustrato utilizado en los ensayos de AME depende del grupo de bacterias cuya actividad se pretende analizar. Puesto que el objetivo de este trabajo es la actividad de las bacterias metanogénicas acetoclásticas, se ha utilizado acetato como sustrato.

En este caso se probó primero con acético y después con acetato de sodio. El ácido acético se ajustaba con NaOH al pH deseado, por lo que al final era lo mismo añadir acético que acetato de sodio, la única diferencia era la forma en la que se encuentra cada uno, el acético esta en forma líquida y el acetato en forma solida.

Se montaron dos muestras con sus dos blancos, una para cada forma de sustrato. Para comparar mejor los resultados, las muestras tenían la misma relación S/I, como se puede ver en la Tabla 11.

Muestra	Sustrato	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	S/I g/l
M1	Acético	300	100	1,13	5,61	0,201
M2		300	100	0,00	5,61	0,000
M3	Acetato de sodio	300	200	2,25	11,22	0,201
M4		300	200	0,00	11,22	0,000

Tabla 11. Características de los ensayos para el estudio de la influencia del tipo de sustrato.

En la siguiente tabla se muestran los valores de la R_{MAX} del ajuste de Gompertz para este ensayo.

Muestra	R _{MAX} (Ajuste Gompertz) (mL CH ₄ /h)
M1	0,350
M2	0,280
M3	0,690
M4	0,650

Tabla 12. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia del tipo de sustrato.

Como se observa en el Gráfico 7, los valores de AME obtenidos para las dos formas de sustratos fueron similares, lo cual es fácilmente explicable puesto que es el mismo sustrato. Debido a esto se decidió seguir usando para el resto de pruebas el acetato de sodio porque al poder añadirlo en gramos no ocupa espacio dentro de la botella. Esto hace que en ensayos posteriores el volumen que debía ocupar el ácido acético pueda ser utilizado para añadir mayor cantidad de fango, y con ello poder variar más la relación S/I para conseguir optimizar al máximo la actividad metanogénica.

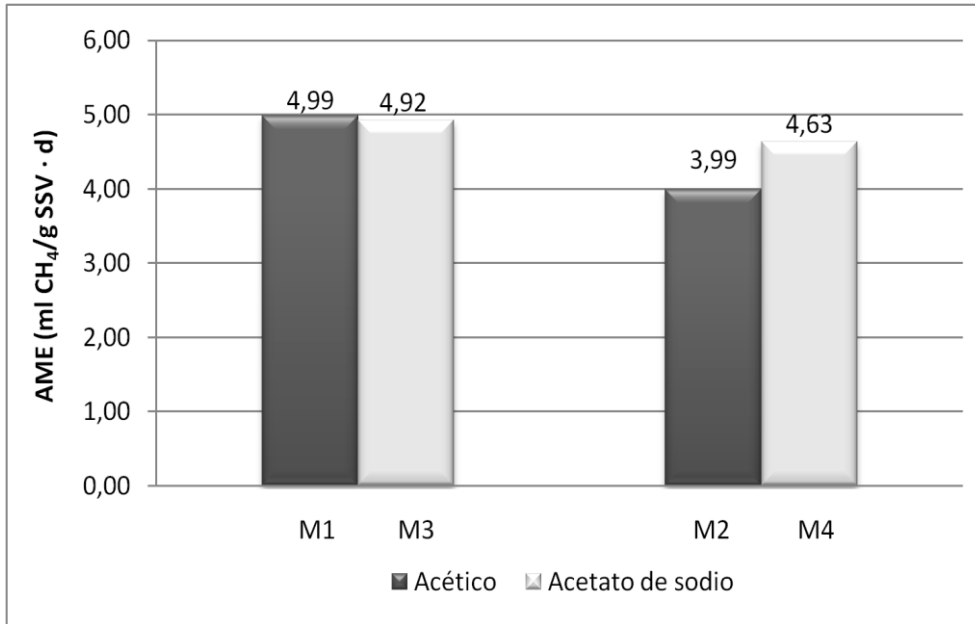


Gráfico 7. Influencia del tipo de sustrato en la AME.

En este ensayo, la comparación de los porcentajes de CH₄ calculado por las dos vías se muestran en la Tabla 13, y una vez mas los valores coinciden, demostrando así que los ensayos que se estan llevando a cabo son correctos, por esto, a partir de este momento se asumió que la metodología empleada era correcta y no se realizaron mas análisis cromatográficos.

	M1	M2	M3	M4
% CH₄ Experimental	10,70	8,78	10,61	8,54
% CH₄ cromatografía	12,93	9,69	12,33	9,30

Tabla 13. Comparación de los porcentajes de CH₄ en los ensayos de la influencia del tipo de sustrato.

4.4.2 Concentración de sustrato

En la Tabla 14 se muestran las características de los ensayos realizados para estudiar la influencia de la concentración de sustrato en la actividad metanogénica específica. Para estudiar únicamente la influencia de la concentración del sustrato se mantuvo en todos los

ensayos la misma concentración de inóculo y los mismos volúmenes totales y se añadieron concentraciones de sustrato con valores entre 0,05 y 0,5 g/l. Todas las concentraciones se probaron por duplicado y además se montaron dos blancos (M11 y M12)

Muestra	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	S/I g/l
M1	300	300	0,05	8,32	0,006
M2	300	300	0,05	8,32	0,006
M3	300	300	0,10	8,32	0,012
M4	300	300	0,10	8,32	0,012
M5	300	300	0,20	8,32	0,024
M6	300	300	0,20	8,32	0,024
M7	300	300	0,35	8,32	0,042
M8	300	300	0,35	8,32	0,042
M9	300	300	0,50	8,32	0,060
M10	300	300	0,50	8,32	0,060
M11	300	300	0,00	8,32	0,000
M12	300	300	0,00	8,32	0,000

Tabla 14. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones bajas de sustrato.

En la siguiente tabla se muestran los valores de la R_{MAX} del ajuste de Gompertz para cada una de las muestras.

Muestra	R _{MAX} (Ajuste Gompertz) (ml CH ₄ /h)
M1	0,54
M2	0,51
M3	0,81
M4	0,51
M5	0,58
M6	0,50
M7	0,44
M8	0,33
M9	0,55
M10	0,52
M11	0,52
M12	0,58

Tabla 15. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones bajas de sustrato.

Como se puede observar en el Gráfico 8, los valores de AME obtenidos fueron valores sin grandes diferencias entre sí y valores en general muy bajos si los comparamos con otros encontrados en la bibliografía (Ryan *et al.*, 2010), por lo que se pensó la posibilidad de que las concentraciones de acetato que se estaban utilizando fueran demasiado bajas.

Al haber realizado los ensayos por duplicado, los valores que se muestran en el gráfico son los valores medios obtenidos.

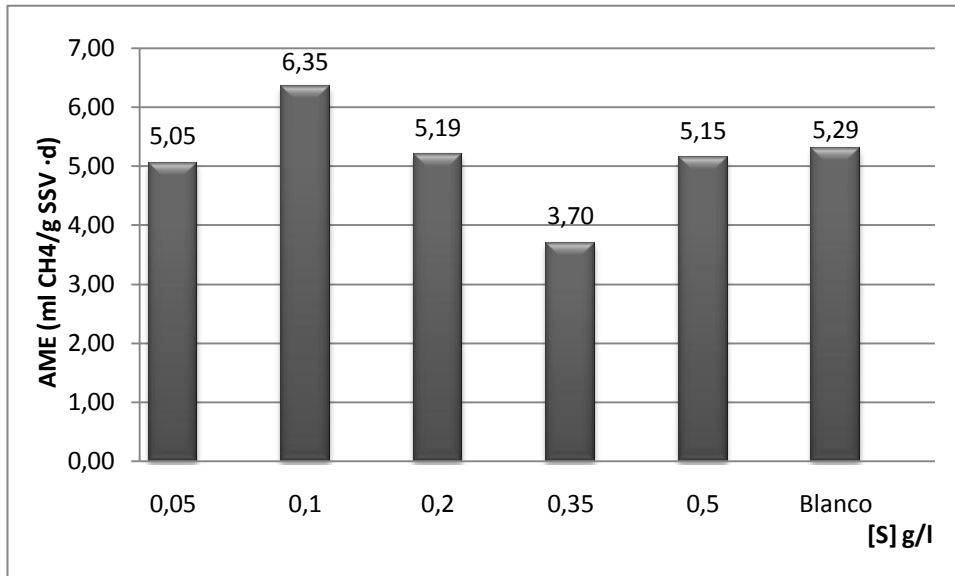


Gráfico 8. Influencia de la concentración de sustrato en la AME. Concentraciones bajas de sustrato.

Por tanto, se hizo un nuevo ensayo en el que se probaron concentraciones de acetato más elevadas, entre 0,05 y 4 g/l, para comprobar si la baja AME obtenida en el ensayo anterior se debía a una baja cantidad de sustrato. Las características de este nuevo ensayo se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	S/I g/l
M1	300	300	0,05	6,74	0,007
M2	300	300	0,20	6,74	0,030
M3	300	300	0,20	6,74	0,030
M4	300	300	1,00	6,74	0,148
M5	300	300	2,00	6,74	0,297
M6	300	300	4,00	6,74	0,593
M7	300	300	0,00	6,74	0,000
M8	300	300	0,00	6,74	0,000

Tabla 16. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones altas de sustrato.

Los valores del R_{MAX} del ajuste de Gompertz para este ensayo fueron los siguientes.

Muestra	R_{MAX} (Ajuste Gompertz) (ml CH ₄ /h)
M1	0,61
M2	0,82
M3	0,78
M4	0,77
M5	0,97
M6	0,81
M7	0,55
M8	0,54

Tabla 17. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones altas de sustrato.

En este caso, como se puede observar en el Gráfico 9, la mayor actividad se ha obtenido para la concentración de sustrato de 2 g/l, por encima de esta concentración la actividad empieza a disminuir, posiblemente debido a que se esté produciendo una inhibición de la actividad metanogénica por sustrato. Por el contrario, a concentraciones más bajas, como es el caso de la muestra que contenía únicamente 0.05 g/l de sustrato, la actividad era más baja, en este caso puede ser debido a que no hay sustrato suficiente para un buen crecimiento de las bacterias metanogénicas, lo que corrobora otra vez los resultados del primer ensayo a bajas concentraciones.

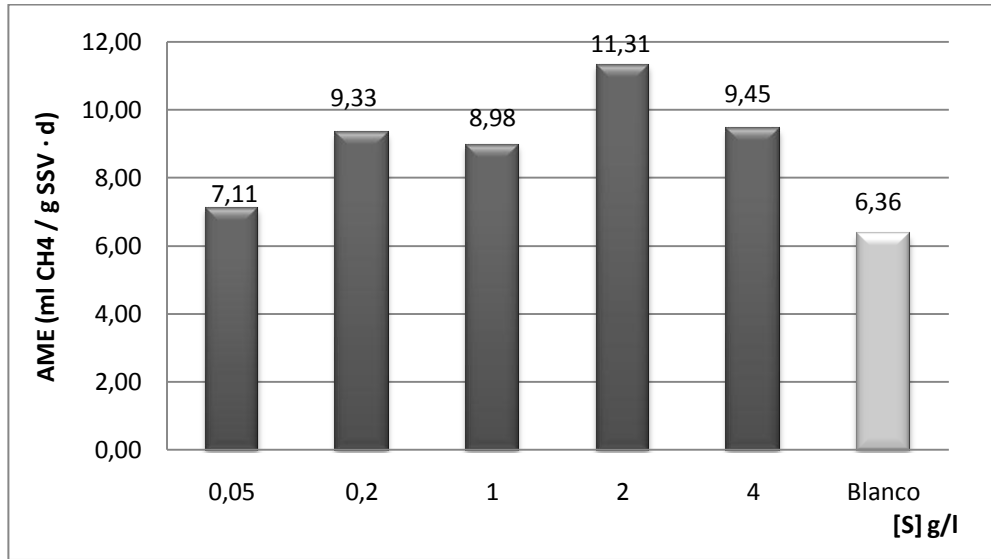


Gráfico 9. Influencia de la concentración de sustrato en la AME. Concentraciones altas.

Para poder comprobar experimentalmente que realmente a medida que aumenta la concentración de sustrato por encima de los 2 g/l la actividad metanogénica disminuye, se realizó un ensayo más con una concentración de sustrato aún mayor a las probadas hasta ahora, como se muestra en la Tabla 18.

Muestra	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	S/I g/l
M1	300	300	0,00	7,77	0
M2	300	300	0,00	7,77	0
M3	300	300	5,00	7,77	0,643
M4	300	300	5,00	7,77	0,643

Tabla 18. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones muy altas de sustrato.

En este caso, los valores de la R_{MAX} del ajuste de Gompertz son los que se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	R _{MAX} (Ajuste Gompertz) (ml CH ₄ /h)
M1	0,84
M2	0,76
M3	0,22
M4	0,22

Tabla 19. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de sustrato. Concentraciones muy altas de sustrato.

En el Gráfico 10 se representan los valores de AME obtenidos en el ensayo anterior para concentraciones de sustrato entre 0,05 y 4 g/l (en color más oscuro) y los nuevos resultados para la concentración de 5 g/l (en color más claro).

Al realizar este ensayo, es cuando se puede comprobar totalmente que se necesita una concentración de sustrato en exceso para conseguir una reacción de orden cero para que la velocidad de crecimiento de las bacterias no esté limitada. Sin embargo, no por añadir mayor cantidad de sustrato se consigue una mayor actividad metanogénica, lo cual se ha visto en la prueba realizada con una concentración de sustrato de 5 g/l, en la que la AME obtenida es muy baja, siendo incluso menor que la del blanco. Esto es debido a que a concentraciones muy altas se está produciendo una inhibición por sustrato, concretamente por salinidad debido al Na⁺ del sustrato acetato de sodio, tal y como se verá en el apartado 4.8.

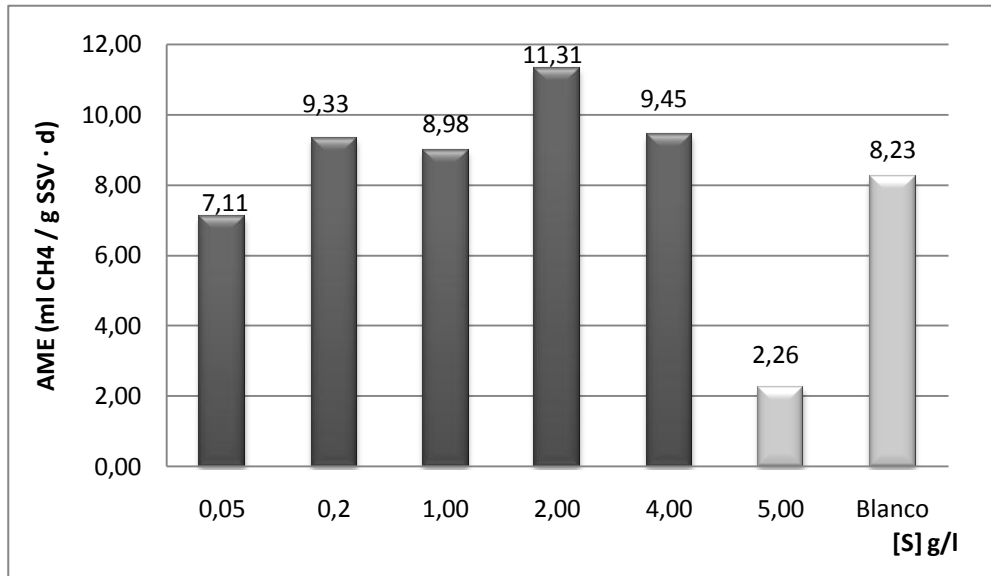


Gráfico 10. Influencia de la concentración de sustrato en la AME. Concentraciones muy altas.

Con esto, se puede comprobar cómo en el ensayo para el estudio de la concentración de sustrato en la AME, los resultados obtenidos coinciden con los encontrados por otros autores (Souto *et al.*, 2010), donde exponen que el mayor valor de la AME se obtiene concretamente para la concentración de sustrato de 2 g/l.

4.5 Influencia de la relación sustrato/inóculo

Otro factor que puede llegar a influir en la AME es la relación de las cantidades de sustrato y de inóculo (S/I) utilizadas, por lo que también se llevaron a cabo pruebas para estudiar su influencia. La Tabla 20 muestra los ensayos realizados para el estudio de la influencia de la relación S/I, que se varió entre valores de 0,007 y 0,643 g/l.

Muestra	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	S/I g/l
M1	300	300	0,05	6,74	0,007
M2	300	300	0,20	6,74	0,030
M3	300	300	0,20	6,74	0,030
M4	300	300	1,00	6,74	0,148
M5	300	300	2,00	6,74	0,297
M6	300	300	4,00	6,74	0,593
M7	300	300	5,00	7,77	0,643
M8	300	300	5,00	7,77	0,643
M9	300	300	0,00	6,74	0,000
M10	300	300	0,00	6,74	0,000

Tabla 20. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la relación S/I.

Los valores de la R_{MAX} del ajuste de Gompertz para este ensayo se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	R_{MAX} (Ajuste Gompertz) (ml CH ₄ /h)
M1	0,61
M2	0,82
M3	0,78
M4	0,77
M5	0,97
M6	0,81
M7	0,22
M8	0,22
M9	0,55
M10	0,54

Tabla 21. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la relación S/I.

En el Gráfico 11 se muestran los resultados obtenidos de la AME en función de la relación S/I para cada muestra. Según se observa, a medida que aumenta la S/I aumenta la AME, siempre y cuando la relación S/I no suponga una concentración de sustrato inhibitoria para las bacterias. En este ensayo, el mayor valor de AME se ha obtenido para una relación S/I de 0.3 g/l.

Por lo tanto, esta es otra de las variables que se debe optimizar a la hora de planificar en el ensayo de la AME.

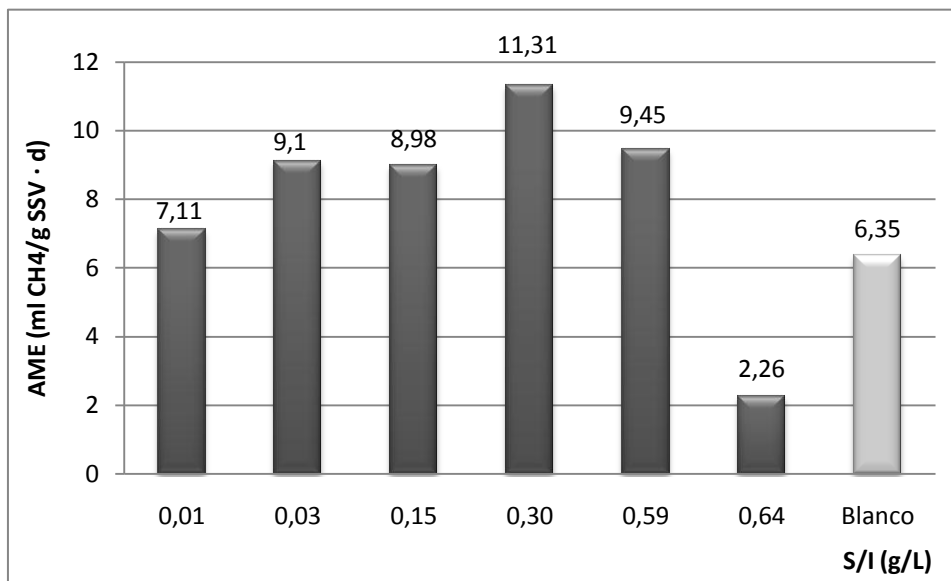


Gráfico 11. Influencia de la relación S/I en la AME.

4.6 Influencia de la concentración de tampón

En los primeros ensayos realizados se empezó utilizando el tampón NaHCO₃ con una concentración de 2 g/l pero no se llegaron a extraer resultados relevantes debido a que en las botellas se formaba un sobrenadante blanco y a que en las primeras horas registradas por el OxiTop® se observaba una bajada de las presiones, como se puede apreciar en el Gráfico 12. Tras esto, se supuso que posiblemente era debido a una cantidad excesiva de tampón, por lo que se montaron entonces nuevas botellas disminuyendo la concentración del tampón NaHCO₃ a la mitad, es decir, a 1 g/l.

A pesar de la disminución de la cantidad de tampón en las botellas, se volvió a formar el sobrenadante blanco, por lo que no era cuestión de la cantidad y se llegó a la conclusión de que influían los equilibrios químicos. Entre el CO_2 y el H_2CO_3 existe un equilibrio gas-liquido que vendrá dado por la ley de Henry. El H_2CO_3 que hay disuelto depende de la concentración que hay en la fase gas, por tanto, como el CO_2 de la fase gas está siendo absorbido por la sosa, el H_2CO_3 se desprende continuamente hacia la fase gas según la ley de equilibrio. Al mismo tiempo, la cantidad de cada una de las especies disueltas depende del pH y del pKa de los pares de especies, de modo que a un pH determinado, la distribución de las diferentes especies viene dada por los diferentes pKa. Sin embargo, como debido al equilibrio gas-liquido el H_2CO_3 se está consumiendo continuamente, el equilibrio se descompensa. Para contrarrestar esto, el equilibrio químico se desplaza hacia la formación del H_2CO_3 continuamente hasta que se agota todo el CO_2 procedente del bicarbonato que ha sido añadido como tampón. Todo esto provoca un descenso de las presiones en las primeras horas de ensayo llegando incluso a valores negativos, como se observa en el Gráfico 12. Por lo que se llegó a la conclusión de que no se puede usar el NaHCO_3 como tampón cuando se está utilizando NaOH para absorber el CO_2 del biogás.

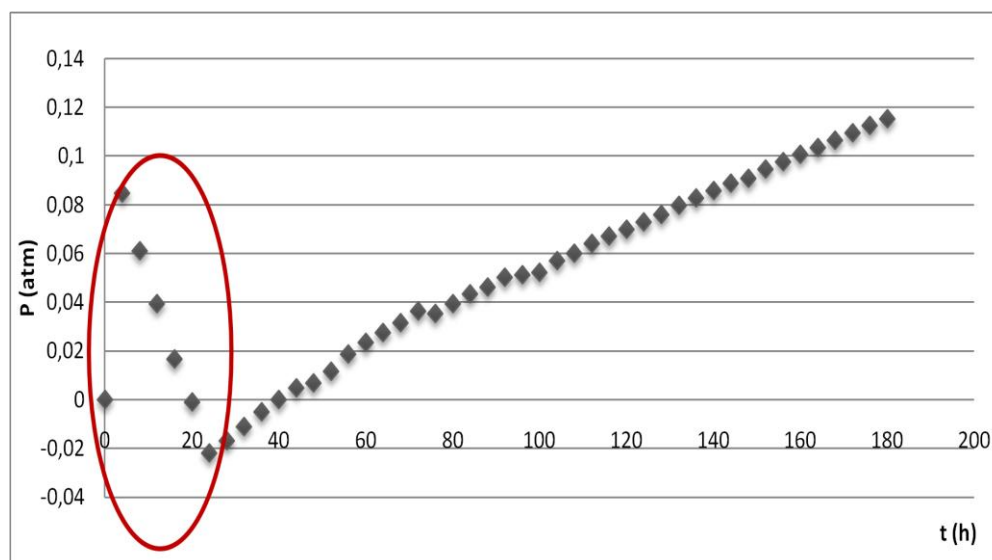


Gráfico 12. Efecto de la reabsorción del CO_2 por el uso del tampón NaHCO_3 .

Por tanto, a partir de este momento todos los ensayos se realizaron con un tampón de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , el cual no influirá en los equilibrios químicos, y se procedió a hacer pruebas de varias concentraciones diferentes para comprar su influencia sobre la AME y poder optimizar la cantidad de tampón. Para estudiar únicamente la influencia de la concentración del tampón se mantuvieron las mismas concentraciones de sustrato e inóculo para las tres muestras del ensayo (M1, M2 y M3) y para sus respectivos blancos (M4, M5 y M6), como se muestra en la Tabla 22.

Muestra	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	Tampón g/0,3 l	
					K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
M1	300	300	0,20	7,55	0,7230	0,4080
M2	300	300	0,20	7,55	0,3615	0,2040
M3	300	300	0,20	7,55	0,1808	0,1020
M4	300	300	0,00	7,55	0,7230	0,4080
M5	300	300	0,00	7,55	0,3615	0,2040
M6	300	300	0,00	7,55	0,1808	0,1020

Tabla 22. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de tampón.

Para este ensayo los valores de R_{MAX} del Ajuste de Gompertz fueron los siguientes:

Muestra	R_{MAX} (Ajuste Gompertz) ml CH ₄ /h
M1	0,49
M2	0,42
M3	0,89
M4	0,57
M5	0,69
M6	0,81

Tabla 23. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de tampón.

Como se observa en el Gráfico 13, la mayor AME se obtiene para una concentración de tampón de K_2HPO_4 0,1808 g/0.3l y de KH_2PO_4 0,1020 g/0.3l tanto para la muestra (M3) como para el blanco (M6). La AME de la muestra que contiene esta concentración llegó incluso a ser el doble que en las otras dos muestras con concentraciones superiores. En el gráfico se representan en color oscuro las muestras y en color claro los blancos.

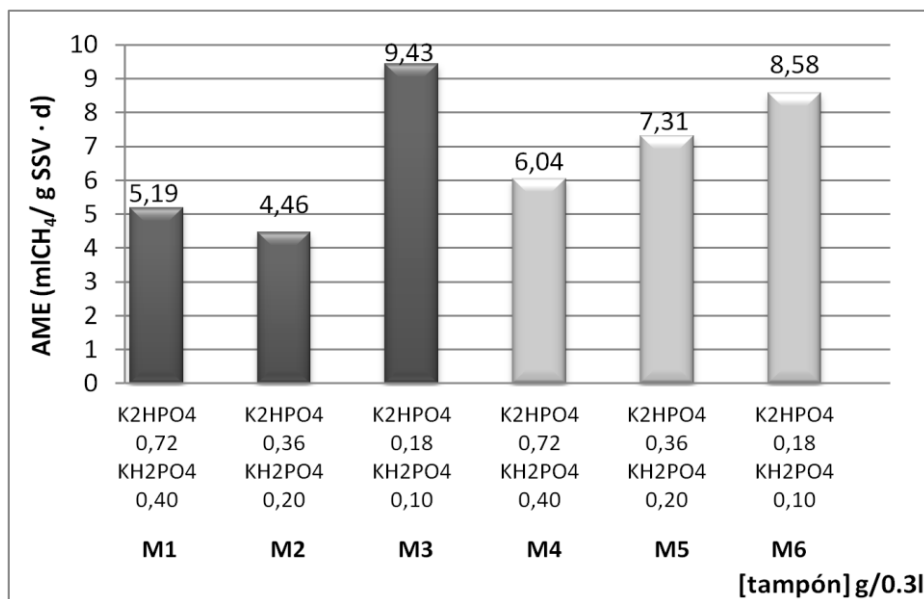


Gráfico 13. Influencia de la concentración de tampón en la AME.

Después de observar estos resultados, se planteó realizar otra batería de experimentos con una muestra de fango de distinto día pero de la misma planta para corroborar los resultados. En este caso, igual que en el anterior, se han mantenido las mismas condiciones de sustrato e inóculo en todas las muestras para que el único factor que pueda influir en la actividad de las bacterias sea la concentración de tampón. Como se puede ver en la Tabla 24, lo que se ha hecho es repetir por duplicado y sus dos blancos la prueba con la concentración menor de tampón, la cual fue la que mejores resultados dio en el ensayo anterior, y compararlas con otra botella montada con una concentración cuatro veces mayor y su blanco.

Muestra	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	[S] g/l	[I] g/l	Tampón g/0,3 l	
					K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
M1	300	300	0,20	6,86	0,1808	0,1020
M2	300	300	0,20	6,86	0,1808	0,1020
M3	300	300	0,00	6,86	0,1808	0,1020
M4	300	300	0,00	6,86	0,1808	0,1020
M5	300	300	0,20	6,86	0,7230	0,4080
M6	300	300	0,00	6,86	0,7230	0,4080

Tabla 24. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de tampón. Comprobación de la concentración elegida como óptima.

Los valores de la R_{MAX} del Ajuste Gompertz obtenidos fueron los que se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	R _{MAX} (Ajuste Gompertz) ml CH ₄ /h
M1	0,82
M2	0,78
M3	0,55
M4	0,54
M5	0,53
M6	0,52

Tabla 25. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la concentración de tampón. Comprobación de la concentración elegida como óptima.

Tras este segundo ensayo ya se comprueba que la cantidad de tampón elegida como la óptima para la AME en el ensayo anterior es la correcta puesto que en esta prueba también se consiguió relacionar la menor concentración de tampón con la mayor AME. Además, incluso los blancos con menor concentración de tampón (M3 y M4) dieron un valor del mismo orden de AME que las muestras con una cuádruple cantidad de tampón (M5 y M6). Todo esto se puede apreciar en el siguiente gráfico donde en color oscuro están representados los valores medios de las AME de las muestras y en color claro la de blancos.

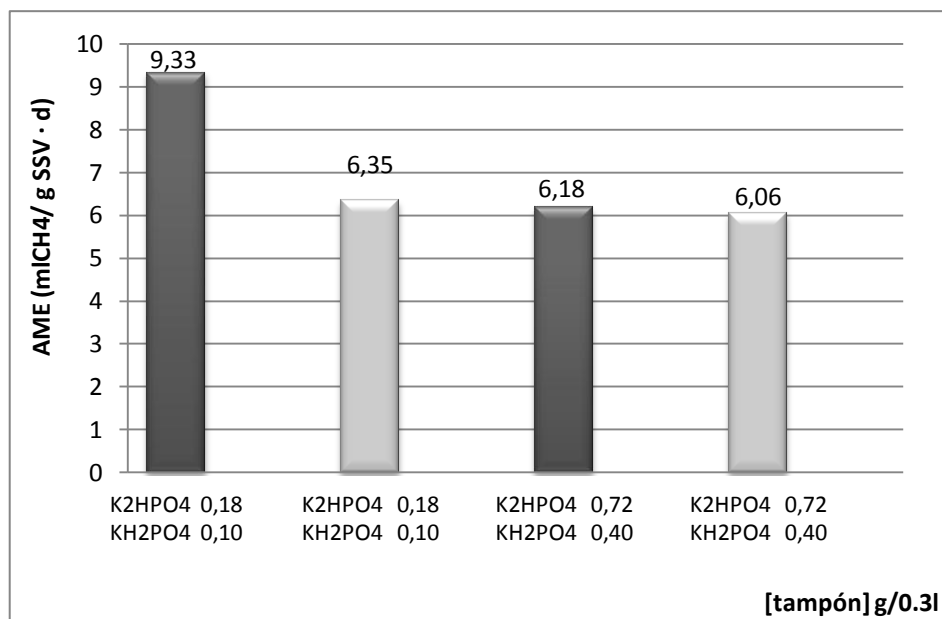


Gráfico 14. Influencia de la concentración de tampón en la AME. Comprobación de la concentración elegida como óptima.

4.7 Influencia del tipo de agitación

El tipo de agitación es un factor que se empezó a estudiar cuando ya se habían realizado la mitad de los experimentos. Se consideró que debía haber una agitación para ayudar a conseguir una mezcla adecuada entre el sustrato y los microorganismos, por lo que se utilizó una agitación axial. Sin embargo, los resultados de AME obtenidos no fueron buenos, por lo que se pensó que este tipo de agitación podría estar provocando la ruptura de los flóculos microbianos, y por tanto reduciendo la actividad metanogénica. Debido a esto, se pensó probar otro tipo de agitación alternativa a la agitación axial, y puesto que no se contaba con equipo para llevar a cabo una agitación orbital, se probó la agitación manual. Por tanto, lo que se hizo es agitar manualmente las botellas de los ensayos antes de realizar la medida de la presión, para facilitar la salida del gas producido hacia el espacio de cabeza. Tras probar este tipo de agitación se comprobó que los valores de presiones obtenidos eran mayores, lo cual se traduciría en una mayor producción de CH₄ y por tanto en una mayor AME. Debido a esto, todos los ensayos realizados para estudiar el

resto de variables experimentales se llevaron a cabo con una agitación manual, y todos los valores de AME obtenidos fueron superiores a los obtenidos cuando se aplicaba una agitación axial.

4.8 Influencia de la conductividad

La conductividad es el último factor que se estudió debido a que en un principio no se había considerado como un factor que pudiera influir en la actividad metanogénica de la bacterias, pero tras estudiar la influencia de la concentración de sustrato, y comprobar que a partir de cierta concentración la AME empezaba a disminuir, se pensó que podría estar produciéndose un efecto inhibitorio por salinidad (por una acumulación de iones) debido principalmente a un exceso de Na^+ del sustrato acetato de sodio. Con este fin se estudió la conductividad de las muestras y su influencia sobre la AME. Además, teniendo en cuenta que el tampón utilizado ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) aportará iones K^+ , este también va a influir en el aumento de la salinidad.

Por tanto, para estudiar la influencia de la salinidad lo que se hizo es un ensayo con muestras con diferentes concentraciones de sustrato. Esto supondrá tener muestras con diferentes concentraciones de iones Na^+ y así, a la salinidad producida por estos iones, poder sumarle la aportada por la de iones K^+ del tampón. Los cálculos realizados para conocer las concentraciones de los iones y de la salinidad total en cada muestra han sido explicados en el apartado 3.3.5. En cuanto a los valores de conductividad, fueron medidos mediante un conductímetro.

Las botellas montadas para estudiar la conductividad se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	V _{TOTAL}	V _{FANGO}	[S]	[I]	Tampón g/0,3 l	
	ml	ml	g/l	g/l	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
M1	300	300	0,00	6,74	0,1808	0,1020
M2	300	300	0,00	6,74	0,1808	0,1020
M3	300	300	0,05	6,74	0,1808	0,1020
M4	300	300	0,20	6,74	0,1808	0,1020
M5	300	300	0,20	6,74	0,1808	0,1020
M6	300	300	1,00	6,74	0,1808	0,1020
M7	300	300	2,00	6,74	0,1808	0,1020
M8	300	300	4,00	6,74	0,1808	0,1020

Tabla 26. Características de los ensayos para el estudio de la influencia de la conductividad.

Se estudiaron las concentraciones tanto de potasio como de sodio para poder conocer qué cantidades contenían las botellas tras añadirselas mediante el tampón (K⁺) y el sustrato (Na⁺). Tras calcular las cantidades de ambos iones, se observa como el que aporta mayores concentraciones de iones es el sodio. Una vez conocidas las cantidades de los dos iones, se pudo conocer la salinidad aportada al fango tras añadir el tampón y el sustrato. El valor de la salinidad va a marcar la tendencia de la conductividad debido a que son directamente proporcionales. Los valores de iones aportados, de salinidad total y de conductividad medida, se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	V _{TOTAL}	V _{FANGO}	[S]	[I]	Iones (ppm)		Salinidad	Conductividad
	ml	ml	g/l	g/l	[K ⁺]	[Na ⁺]	ppm	
M1	300	300	0,00	6,74	110,53	0,0	110,53	3,00
M2	300	300	0,00	6,74	110,53	0,0	110,53	3,10
M3	300	300	0,05	6,74	110,53	8,5	119,03	3,13
M4	300	300	0,20	6,74	110,53	33,8	144,33	3,26
M5	300	300	0,20	6,74	110,53	33,8	144,33	3,13
M6	300	300	1,00	6,74	110,53	168,0	278,53	3,99
M7	300	300	2,00	6,74	110,53	338,0	448,53	5,17
M8	300	300	4,00	6,74	110,53	676,1	786,63	7,32

Tabla 27. Concentraciones añadidas de iones K⁺ y Na⁺ en cada muestra para el estudio de la influencia de la conductividad. Salinidad total y valores medidos de conductividad.

Por tanto, con esto se puede concluir que la concentración de sustrato añadida va a influir significativamente en la salinidad, lo cual se observa claramente en los valores de las conductividades medidas de las muestras después de añadir el sustrato, ya que cuanto mayor es la concentración de sustrato añadida mayor es la salinidad.

En este último ensayo los valores de R_{MAX} del Ajuste Gompertz fueron los que se muestran en la Tabla 28.

Muestra	R_{MAX} (Ajuste Gompertz) mL/h
M1	0,55
M2	0,54
M3	0,61
M4	0,82
M5	0,78
M6	0,77
M7	0,97
M8	0,81

Tabla 28. Valores de la R_{MAX} del Ajuste de Gompertz para los ensayos de la influencia de la conductividad.

Una vez observado que al aumentar la cantidad de sustrato se estaba añadiendo cada vez una mayor cantidad de iones, se comprobó lo que se había comentado en el apartado 4.4.2 donde se exponía que había una concentración de sustrato a partir de la cual se estaba produciendo una inhibición que disminuía la AME. Por tanto, es este apartado, tras estudiar la influencia de la salinidad es cuando se confirma este hecho y que es debido a un exceso de iones K^+ y Na^+ .

Todo esto se explica con el fenómeno de la presión osmótica, puesto que al aumentar las concentraciones de tampón y sustrato añadidas se están añadiendo cada vez más iones K^+ y Na^+ respectivamente. Debido a esto, la salinidad en el medio va a ser cada vez mayor, por lo que las bacterias van a tender a igualar las concentraciones entre el interior celular y el

medio y para ello expulsan el agua del interior de la célula hacia el medio. Es por esto por lo que cuanto más salino es el medio, mas agua van a expulsar lo que provoca una deshidratación de las bacterias y por tanto su muerte, reflejándose en una disminución del valor de la AME como se observa en el Gráfico 15 donde están representados los valores medios de AME frente a la conductividad.

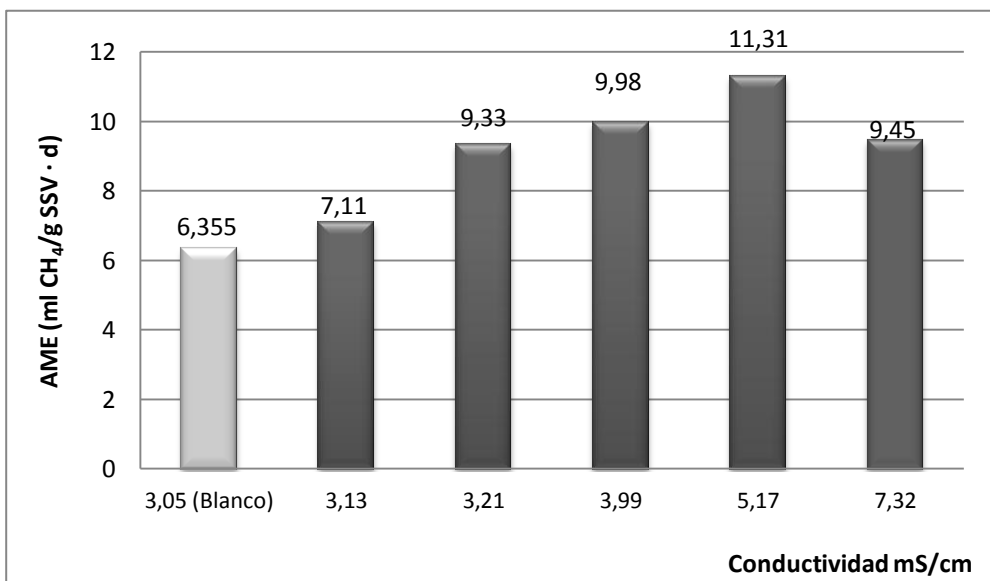


Gráfico 15. Influencia de la conductividad en la AME.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos durante la investigación de los diferentes factores que pueden influir en la AME de un fango anaerobio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Mantener un volumen de fase gaseosa pequeño, de entre un 20 y un 25% del volumen total, permite que se reduzca la duración de la fase de latencia y por tanto la duración total del ensayo. Además, al minimizar el espacio de cabeza hay una mayor cantidad y representatividad de la muestra del fango, dando lugar a valores de AME más representativos.
- Se llevaron a cabo ensayos a 20°C y a 35°C con el fin de estudiar la influencia de la temperatura sobre los valores de AME. Se observó como a 35°C la AME obtenida era mayor. Esto es fácil de explicar puesto que dentro del rango mesofílico (entre 20°C y 40°C) la tasa de crecimiento de los microorganismos metanogénicos es máxima entre los 35-37°C.
- El acetato de sodio es el sustrato con el que se obtuvieron mayores valores de AME, siendo el intervalo de concentración 0.2-2 g/l el que proporcionó los mejores resultados, obteniéndose la mayor actividad para la concentración de 2 g/l. Concentraciones por encima de este rango son inhibitorias. El rango de S/l entre 0.03 y 0.3 g/l proporciona los mayores valores de AME, por encima de este rango supone una concentración mayor de sustrato y por tanto inhiben la actividad de las bacterias metanogénicas.
- Las muestras requieren una agitación manual para conseguir una mayor AME. Si se les proporciona una agitación axial se rompe la estabilidad de los flóculos bacterianos y provoca que la AME obtenida sea la mitad que la producida con agitación manual, la cual produce una agitación más suave.

- El tampón que proporciona mejores resultados es el formado por K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , con unas concentraciones de 0.18 y 0.10 g/0.3l respectivamente. Cantidades inferiores no consiguen que se mantenga el pH óptimo y mayores cantidades provocan una mayor adición al sistema de iones K^+ , lo cual junto a los iones Na^+ del sustrato hacen que aumente la salinidad en la mezcla y disminuye la actividad metanogénica de los microorganismos debido a una inhibición por una elevada conductividad.

Por tanto, para el tipo de fango estudiado en este trabajo, las condiciones óptimas de cada uno de los factores que influyen en la AME se muestran de forma esquemática en la siguiente tabla.

Muestra	V _{TOTAL} ml	V _{FANGO} ml	V _{EC} ml	T °C	Tipo sustrato	[S] g/l	[S]/[I] g/l	Tampón g/0,3 l		Agitación
								K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	
1	300	300	20-25%	35	CH ₃ COONa	0,20-2.0	0,03-0,3	0,1808	0,1020	Manual

Tabla 29. Condiciones óptimas para el estudio de la AME.

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA.

Álvarez, J.A.; Zapico, C.A.; Gómez, M.; Presas, J.; Ruíz, I. y Soto, M. (2001). "Anaerobic treatment and pre-treatment of municipal wastewater at low ambient temperature". Proceed. of the 9th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, Antwerp, 2-7 September, 425-427.

Amaral, M., Ferreira, C., Lange, L. y de Aquilino, S. (2008). Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de lixiviados de aterro sanitários. Vol. 13 No. 1.

Anderson, G.K. and Yang, G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. Water Environ. Res., 64(1), 53–59.

American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. (2005). Standard methods for examination of water and wastewater. 21st Ed., Washington D.C.

Aquino, S., Chernicharo, C., Foresti, E., Florencio Dos Santos, M. y Monteggia, L. (2007). Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) Em Lodos Anaeróbios. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Vol. 12 –No. 2.

Chernicharo, C. (2007). Principios do tratamento biológico de águas residuárias. Universidad Federal de Minas Gerais. Vol V. Brasil.

Ferrer, J., Seco, A. (2003). Tratamientos biológicos de aguas residuales. Editorial UPV. Valencia, España.

Foresti, E., Florencio, L., Van Haadel, A., Zaiat, M. y Cavalcanti, P. (1999). Fundamentos do tratamento anaeróbio. Capítulo 2. En: Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. PROSAB, Brasil.

L. Maya-Altamira, A. Baun, I. Angelidaki, J.E Schmidt (2008). Influence of wastewater characteristics on methane potencial in food-processing industry wastewaters. *Water research*, 42, 2195-2203.

Madigan, Michael, John Martinko y Jack Parker (1998). *Brock Biología de los Microorganismos*. 8ª Edición, traducido de *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, Inc.

Mélida del Pilar Anzola Rojas, Antonio Oliveira Netto, Marcelo Zaiat (2008). Actividad metanogénica específica en un reactor anaerobio-aerobio aplicado al tratamiento de agua residual doméstica. *Interciencia*, abril, año/vol. 33, número 004, pp. 284-289.

Metcalf y Eddy, Inc. (1995). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. 3ª Edició. McGraw-Hill, New York, USA.

Mosey, F. (1993). Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science Technology*. 15, 209-232.

O'Flaherty, V., Mahony, T., O'Kennedy, R. y Collerman, E. (1999). Effect of pH on growth kinetics and sulfide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulfate-reducing bacteria. *Process. Biochem.* 33(5), 555-569.

Orhan Ince, Bahar Kasapgil Ince, Orhan Yenigun (2001). Determination of potencial methane production capacity of a granular sludge from a pilot-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor using a specific methanogenic activity test. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76:573-578.

P. Ryan, C. Forbes, S. McHugh, C. O'Reilly, G.T.A Fleming, E. Colleran (2010). Enrichment of acetogenic bacteria in high rate anaerobic reactors under mesophilic and thermophilic conditions. *Water research* 44, 4261-4269.

Pavlostathis, S.G., and E. Giraldo-Gomez, 1991. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Crit. Rev. Environ. Control* 21:411-490.

Penna, J. (1994). Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica. Tese de doutorado. Escola de Engenharia, USP-São Carlos.

Rittman B.E y McCarty, P.L (2001). Environmental Biotechnology: Principles and Applications. McGraw Hill Inc, New York.

Ronan Le Hyaric, Carolina Chardin, Hassen Benbelkacem, Julien Bollon, Rémy Bayard, Renaud Escudié, Pierre Buffière (2010). Influence os substrate concentration and moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate spiked with propionate. Bioresource Technology.

San, I. and Onay, T.T. (2001) Impact of Various Leachate Recirculation Regimes on Municipal Solid Waste Degradation, Journal of Hazardous Materials, B87, 259-271.

Speece R.E (1983). Biotechnology for anaerobic waste treatment. Env. Sci. & Technol., vol. 17, 416A-427A.

Soto, M. (1994). "Tratamiento de augas residuais". En "Os Residuos na Galiza. Impacto ambiental e alternativas de tratamento". Edit. Bahía, A Coruña, 135-197.

Speece, R. E., (1987). Nutrient Requeriments. En: Anaerobic digestion of biomass. Chynoweth y Isaacson (eds.). Elsevier applied science. p 67- 72.

Speece, R. E. (1996). Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Archae Press, Nashville, Tenn.

Stams, A.J.M. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie van Leeuwenhoek. 66: 271-294 p.

Tatiana F. Souto, Sérgio F. Aquino, Silvana Q. Silva, Carlos A. L. Chernicharo (2010). Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. Biodegradation 21:411-424.

Tchobanoglous G. Burton B.L Stensel H. D (2003). Wastewater Engineering. Treatment and Reuse, Metcalf & Eddy. Inc, The McGraw-Hill Companies, Inc. New York.

Torres Lozada, Patricia; Pérez, Andrea (2010). Actividad metanogénica específica: Una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, núm.9, pp.5-14.

Vlyssides, A.G., Karlis, P.K., 2004. Thermal-alkaline solubilisation of waste activated sludge as a pretreatment stage for anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 91 (2), 201–206.

Warith, M. (2002) Bioreactor Landfills: Experimental and Field Results, *Waste Management*, 22, 7-17.

