

**Tabla 3.9.- Relación de componentes del reactor piloto correspondiente a las referencias de la figura 3.1.**

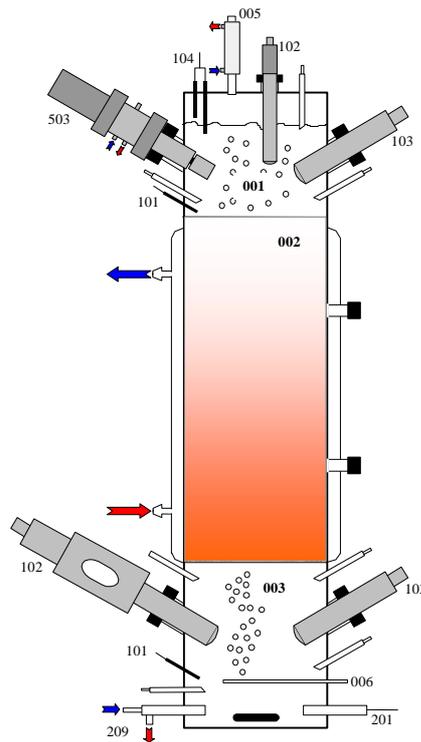
Ref.	Material	Dimensiones/ características	Cantidad	Modelo/Marca/Origen
<b>REACTOR</b>				
001	Parte superior y tapa	Acero inoxidable	1	No comercial, fabricado por Payra / Terrassa, España
002	Parte central	Vidrio	1	No comercial, fabricado por Alco / Terrassa, España
003	Parte inferior	Acero inoxidable	1	No comercial, fabricado por Payra / Terrassa, España
004	Agitador magnético	30-1000 r.p.m.	1	LD-14 / Labinco / Breda, Holanda
005	Condensador	Acero inoxidable, 315 cm <sup>2</sup>	1	Bioengineering, Wald, Suiza
006	Difusor para la aireación	Acero inoxidable	1	No comercial
<b>SENSORES</b>				
101	Temperatura	Pt-100	2	No comercial
102	pH parte superior	12/120, esterilizable	1	InPro 3000/120 / Mettler Toledo / Urdorf, Suiza
	pH parte inferior	Con carcasa presurizable; esterilizable	1	Infit 764-50 Mark I (carcasa) y 465 (electrodo) / Ingold / Urdorf, Suiza
103	Oxígeno disuelto	25/120, esterilizable	2	322 Infit / Ingold / Urdorf, Suiza
104	Nivel	12/80	2	Hauser Lindeman
105	Módulo de presión	0-1000 mbar	1	MCR P/U/I/ Phoenix Contact / Blomberg, Alemania
106	Módulo de temperatura para Pt 100	4-150 °C	2	MCR Pt 100/3/I / Phoenix Contact / Blomberg, Alemania
107	Preamplificador de pH		2	270 / Ingold / Urdorf, Suiza
108	Amplificador de pH		2	271 / Ingold / Urdorf, Suiza
109	Amplificador de O <sub>2</sub>		2	170 / Ingold / Urdorf, Suiza
<b>ACTUADORES</b>				
201	Elemento calefactor		1	No comercial
202	Electroválvula del refrigerante	Cuerpo de acero inoxidable. 220 V, 6 W	1	8263 / ASCO / Scherpenzeel, Holanda

**Tabla 3.9. Continuación.- Relación de componentes del reactor piloto correspondiente a las referencias de la figura 3.1.**

	Material	Dimensiones/ características	Cantidad	Modelo/Marca/Origen	
	203	Bomba peristáltica base	6 rodillos, dos canales	1	MCMS3 / Ismatec / Zürich, Suiza
	204	Bomba peristáltica ácido	6 rodillos, dos canales	1	MCMS3 / Ismatec / Zürich, Suiza
	205	Caudalímetro másico O <sub>2</sub> / electroválvula	500 mL/min	1	225-BX / MKS / Andover, MA, USA
	206	Caudalímetro másico N <sub>2</sub> / electroválvula	20 L/min	1	225-BX / MKS / Andover, MA, USA
	207	Bomba peristáltica extracción (salida)	6 rodillos, 8 canales, para tubo con topes.	1	Ecoline VC-MS/CA8-6 / Ismatec / Zürich, Suiza
	208	Electroválvula, circuito de gas	Cuerpo de acero inoxidable. 220 V, 6 W	1	8263 / ASCO / Scherpenzeel, Holanda
	209	Elemento refrigerante	Acero inoxidable	1	No comercial
<b>CIRCUITO LÍQUIDO</b>	<b>DE</b>				
	301	Válvula antirretorno (caldo de cultivo / medio)	Acero inoxidable, esterilizable	3	HOKE / Creskill, N.J. USA
	302	Válvula antirretorno (ácido / base)	Acero inoxidable, esterilizable; junta especial	2	HOKE / Creskill, N.J. USA
	303	Filtro	0.22 µm	4	Opticap filter / Millipore / Bedford, MA, USA
	304	Bomba peristáltica entrada de medio	6 rodillos, 2 canales, para tubo con topes	1	Reglo analog, MS 2/6C / Ismatec / Zürich, Suiza
	305	Bomba peristáltica recirculación	6 rodillos, 2 canales	1	MCMS3 / Ismatec / Zürich, Suiza
	--	Conducciones	Tubo flexible, diámetro interior 4 mm	--	Norprene / Ismatec / Zürich, Suiza
	--	Conexiones rápidas	La hembra incorpora válvula de cierre automático	--	Tomco / Cleveland, Ohio, USA
	--	Tubos bomba peristáltica	Esterilizables, larga duración, varios diámetros	--	Pharmed / Ismatec / Zürich, Suiza
<b>CIRCUITO GASES</b>	<b>DE</b>				
	401	Válvula antirretorno	Acero inoxidable, esterilizable	1	HOKE / Creskill, N.J. USA
	402	Trampa de líquido	Evitan la entrada de líquido al compresor y al rotámetro	2	No comercial
	403	Caudalímetro másico CO <sub>2</sub> / electroválvula	50 mL/min	1	225-BX / MKS / Andover, MA, USA
	404	Compresor	De membrana	1	KNF / Verder / Leeds, UK

**Tabla 3.9. Continuación.- Relación de componentes del reactor piloto correspondiente a las referencias de la figura 3.1.**

	Material	Dimensiones/ características	Cantidad	Modelo/Marca/Origen
	<b>405</b> Rotámetro con manómetro a la entrada	0-10 L/min; 0-2 barg	1	3033/JC / KDG /Sussex, UK
	<b>406</b> Filtro cerámico	Montado en carcasa de acero inoxidable	2	Bioengineering, Wald, Suiza
	<b>407</b> Filtro aire	0.22 µm	4	Millipore / Bedford, MA, USA
	<b>423-430</b> Válvula de bola	Acero inoxidable	8	Whitey / USA
	-- Conducciones tramo estéril	DN 6; pared 1 mm, acero inox	--	Bioengineering, Wald, Suiza
	-- Conducciones tramo no estéril	Tubo flexible, 4mm diámetro interno	--	Norprene / Ismatec / Zürich, Suiza
<b>ANALIZADORES</b>				
	<b>501</b> Analizador de amonio	0 - 30 mg/L N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1	Nitrax LYX 720 / Dr Lange / Düsseldorf, Alemania
	<b>502</b> Analizador de nitrato	0 – 100 mg/L N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1	Amtax LPG 192 / Dr Lange / Düsseldorf, Alemania
	<b>503</b> Dispositivo de extracción de muestra libre de biomasa	Membrana cerámica rotatoria, con sensor de presión incorporado	1	Persep / Tech Sep / Miribel, Francia
	<b>504</b> Bomba del circuito de análisis	6 rodillos, dos canales	1	MCMS3 / Ismatec / Zürich, Suiza
<b>EQUIPOS AUXILIARES</b>				
	<b>601</b> Baño termostático, regulador de temperatura	Regula la temperatura de la camisa.	1	Tectron Bio / Selecta / Abrera, España
	<b>602</b> Baño termostático refrigerante, regulador de temperatura	Refrigera el reactor, condensador el y el dispositivo de extracción libre de biomasa	1	D8 + N4-R / Haake / Karlsruhe, Alemania
<b>TANQUES</b>				
	<b>701</b> Entrada de medio	50 L	1	Nalgene/ Hereford, UK
	<b>702</b> Salida	50 L	1	Nalgene/ Hereford, UK
	<b>703</b> Base	20 L	1	Nalgene/ Hereford, UK
	<b>704</b> Ácido	1 L	1	Pyrex / Francia
<b>CONTROLADORES</b>				
	<b>801</b> Controladores programables autónomos	4 bucles de control por controlador	4	P100 Sensycon / Hartman&Braun / Nanterre, Francia



**Figura 3.1b.- Esquema del reactor piloto. Las referencias se detallan en la tabla 3.9.**

El soporte utilizado para la inmovilización de la biomasa consiste en partículas esféricas de poliestireno, cuyo nombre comercial es Biostyr® (Anjou Recherche, París, Francia). Este material se seleccionó en estudio preliminares, previos a este trabajo, como se ha señalado en el capítulo introductorio. Las características físicas de este material son (Forler, 1994):

- Diámetro medio:  $(4.1 \pm 0.5)$  mm
- Densidad del poliestireno:  $18.66 \text{ Kg/m}^3$
- Densidad de la partícula:  $17.60 \text{ Kg/m}^3$
- Distribución del tamaño de partícula: se presenta en la **figura 3.2**.

El soporte se halla confinado a la zona central del reactor (lecho, referencia 002) mediante unas rejillas metálicas, que permiten el paso de líquido y gas, pero impiden que las partículas de soporte lleguen a las secciones contiguas.

Este soporte, a pesar de ofrecer resultados satisfactorios en cuanto a inmovilización se refiere, presenta el inconveniente de no poder ser esterilizado por vapor, hecho que fuerza a establecer un laborioso protocolo de esterilización, tal y como se indica a continuación.

El reactor se esteriliza *in situ*, en dos etapas. En primer lugar se esteriliza el reactor vacío (es decir, sin las partículas del soporte del lecho empacado), para lo que se utiliza vapor fluyente. Después se introducen las partículas en el reactor y se esteriliza el lecho empacado químicamente. En la **tabla 3.10.** se detallan los pasos a seguir durante las dos etapas de la esterilización.

A partir de protocolos utilizados en el cultivo de células vegetales (Dixon, 1985) se diseñó un procedimiento para la esterilización química de las partículas que integran el soporte para la biomasa:

- Inmersión del soporte en etanol absoluto durante una hora.
- Lavado con agua destilada estéril.
- Inmersión del soporte (durante una hora) en hipoclorito sódico con un contenido mínimo de  $\text{Cl}_2$  de entre 1.0 y 1.4 %, al cual se le añade detergente (0.05 %).
- Lavado con agua destilada estéril.
- Inmersión en ácido (HCl a pH = 2) durante una hora.
- Lavado con agua destilada estéril.
- Inmersión en base (NaOH a pH = 12) durante una hora.
- Lavado con agua destilada estéril.

Este procedimiento se realiza dos veces: la primera se aplica al soporte fuera de la columna, y la segunda, se realiza una vez el soporte ha sido introducido en el biorreactor, con la ayuda de filtros para líquidos de 0.22  $\mu\text{m}$  (Opticap filter / Millipore / Bedford, MA, USA). En este segundo proceso de esterilización, una vez el soporte se encuentra en el interior de la columna, difiere del descrito en los tiempos de cada una de las etapas, que se aumentan hasta 6-10 horas.

**Tabla 3.10.- Estado de las válvulas del circuito de gas en la operación normal del reactor y en las dos etapas de esterilización (con vapor fluyente y química).**

Ref. nº	Esterilización con vapor fluyente	Esterilización química	Condiciones normales de funcionamiento
423	Abierta	Abierta	Cerrada
424	Abierta	Cerrada	Abierta
425	Abierta	Cerrada	Cerrada
426	Abierta	Cerrada	Abierta
427	Abierta	Cerrada	Cerrada
428	Cerrada	Abierta	Abierta
429	Cerrada	Cerrada	Abierta
430	Cerrada	Cerrada	Abierta

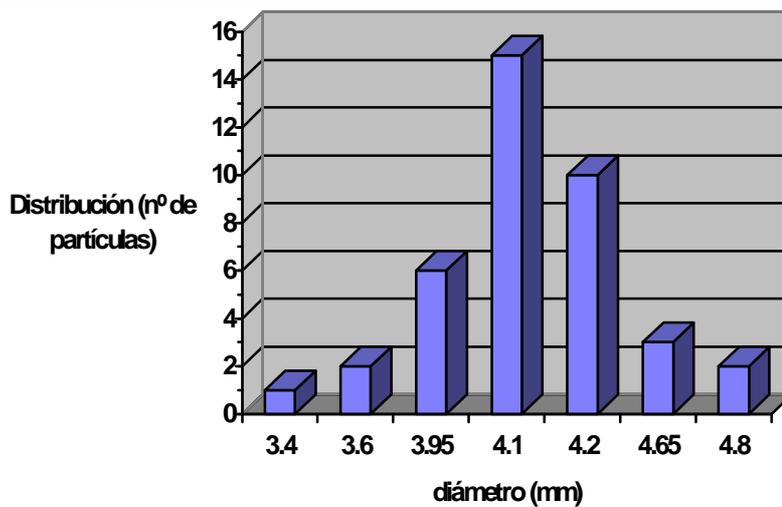


Figura 3.2.- Distribución del diámetro de partícula del soporte para la biomasa (Forler, 1994).

### 3.3.2.- Sistema de control en el reactor piloto

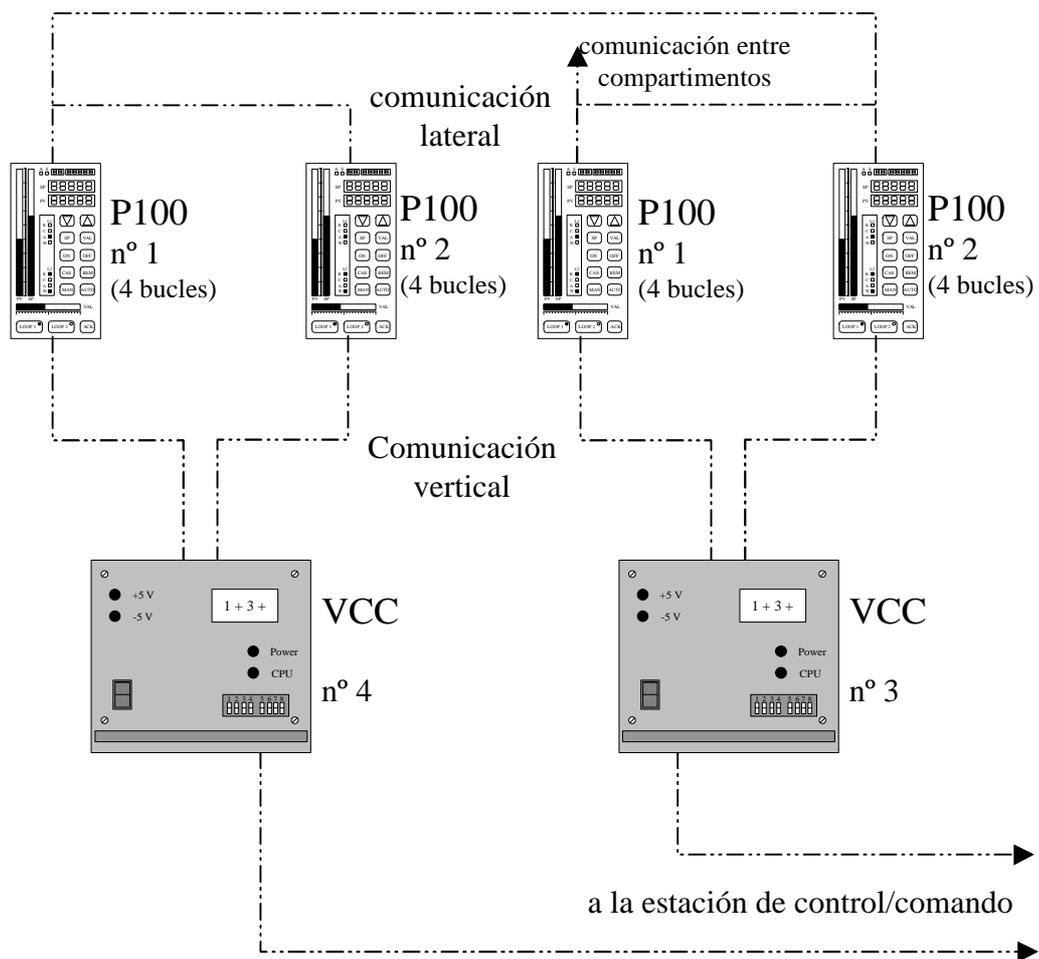
Existen tres niveles de control que pueden actuar sobre el tercer compartimento del bucle MELISSA. El control básico se lleva a cabo mediante controladores de proceso industriales, llamados P100. Estos instrumentos, a su vez, pueden recibir acciones de control remotas a través de la estación de sistema o estación de control/comando (segundo nivel de control). Por encima de estos niveles existe otro jerárquicamente superior que recibe el nombre de *General Purpose Station* (GPS), que es la estación encargada de mantener la operación del bucle MELISSA en su totalidad.

El esquema general de comunicaciones para el control del tercer compartimento se presenta en la **figura 3.3**. Para implementar el control de las condiciones de crecimiento y de operación que se llevan a cabo en el reactor piloto del tercer compartimento, se utilizaron controladores programables autónomos P100 (SENSYCON, Hartman&Braun, Nanterre, Francia), que configuran el ya mencionado primer nivel de control. Por tanto, el sistema de control en sí, las estrategias empleadas, la estructura de los lazos de control, etc., no es un sistema comercial, y éste ha sido desarrollado íntegramente. Además, con anterioridad a la puesta en marcha del reactor, se realizó una exhaustiva revisión de la eficacia de los lazos de control implementados, sintonizando los parámetros de los controladores y estudiando la respuesta del sistema ante perturbaciones reales, utilizando condiciones lo más similares posibles a las que iban a aparecer durante la operación de este reactor.

El compartimento nitrificante dispone de cuatro P100, que están interconectados mediante comunicación lateral, de forma que es posible transferir información de uno a otro. Cada uno de ellos dispone de dos salidas analógicas y dos salidas digitales, cuatro entradas analógicas y cuatro digitales. Éstas se gestionan mediante la programación de cuatro bucles de control (por cada uno de los P100, es decir existen  $4 \times 4 = 16$  bucles de

control disponibles). La programación de estos controladores se puede realizar de dos modos:

- Mediante la configuración directa sobre el panel de mandos lateral de los controladores.
- Utilizando un programa de configuración, instalado en la estación de sistema.



**Figura 3.3.- Comunicación lateral y vertical.**

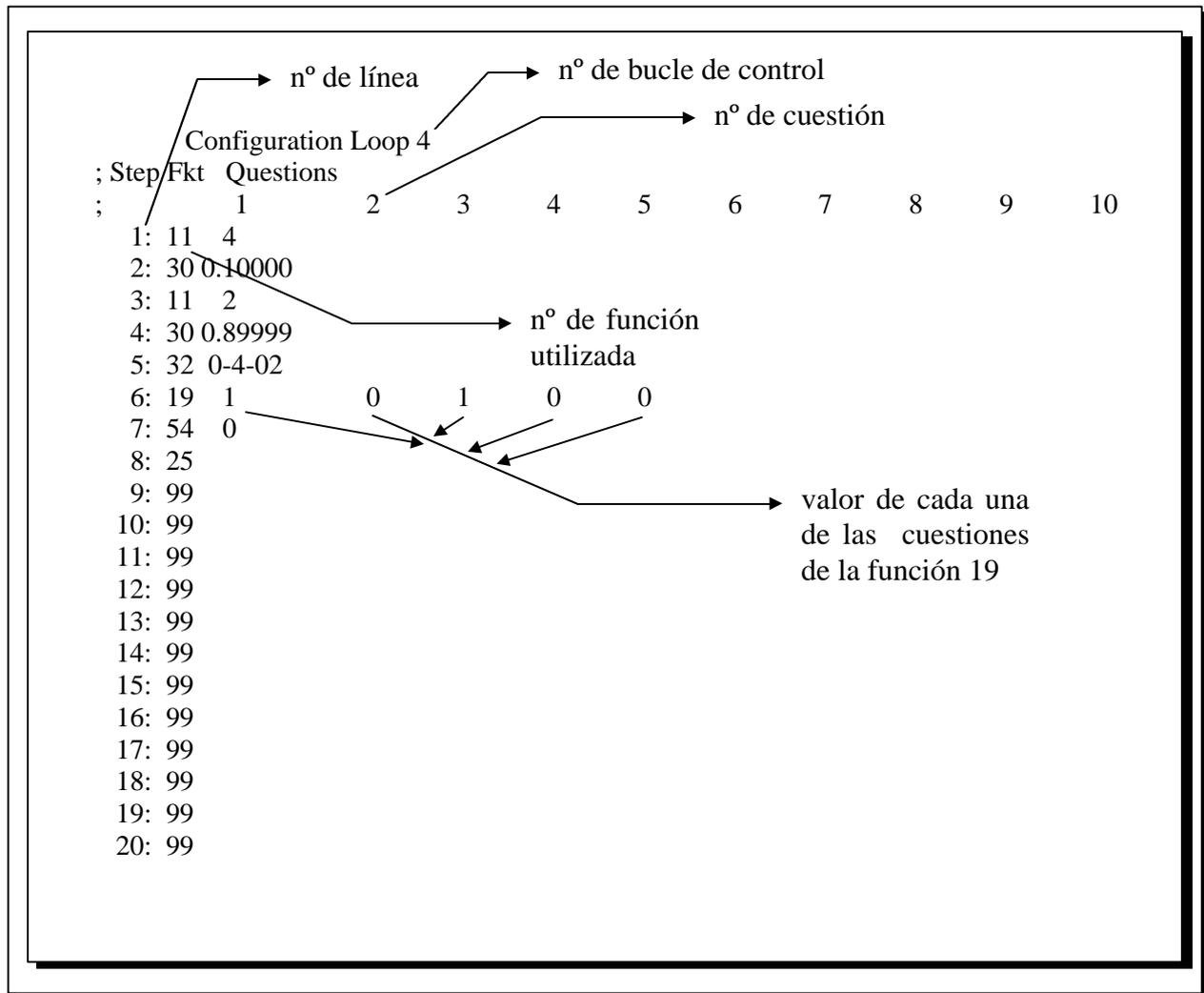
La configuración de los diferentes bucles se efectuó mediante el uso del programa de configuración. Este programa permite la comunicación con los controladores P100 desde la estación de sistema o de control/comando (PC 486 CompaQ, Houston, Texas, USA) a través de la comunicación vertical, para lo que se utilizan unos módulos de comunicación vertical denominados VCC (SENSYCON, Hartman&Braun, Nanterre, Francia). La estación de sistema está comunicada a través de una red Ethernet a la estación GPS (*General Purpose Station*, PC Pentium CompaQ, Houston, Texas, USA) y la estación de usuario (PC 486 CompaQ, Houston, Texas, USA).

### 3.3.2.1.- Configuración de los controladores P100

La programación de los controladores P100 se realiza mediante el uso de unas funciones predefinidas. Para poder utilizar estas funciones es necesario introducirlas en una de las líneas de uno de los bucles (cada uno de los bucles dispone de 20 líneas de programa). Además, estas funciones deben contener una serie de parámetros determinados, que se especifican en las denominadas ‘cuestiones’ (**figura 3.4.**).

Por ejemplo, para introducir un controlador se puede utilizar la función 19, como se puede observar en la figura 3.4. Las cuestiones (de la n<sup>o</sup>1 a la n<sup>o</sup>5), determinan:

- Cuestión n<sup>o</sup>1: valor 0 si el punto de consigna permanece constante al cambiar el modo del controlador de manual (sin control) a automático, valor 1 si el punto de consigna cambia con la velocidad especificada en la rampa, valor 2 si el punto de consigna se ajusta al valor de entrada al controlador en la transición de manual a automático.
- Cuestión n<sup>o</sup>2: valor 0 cuando la acción del controlador aumenta para diferencias entre la entrada al controlador y el punto de consigna positivas y para diferencias negativas disminuye. Valor 1 cuando la acción del controlador aumenta para diferencias entre la entrada al controlador y el punto de consigna negativas y para diferencias positivas disminuye.
- Cuestión n<sup>o</sup>3: valor 0 cuando el controlador se inicializa en modo manual después de una interrupción del suministro eléctrico, valor 1 cuando se reinicializa en modo automático.
- Cuestión n<sup>o</sup>4: la acción integral puede ser no interactiva con el control proporcional  $1/\tau_I$  (valor 0), o interactiva  $K_P/\tau_I$  (valor 1).
- Cuestión n<sup>o</sup>5: la parte derivativa debe ser proporcional a la variable de entrada al controlador (valor 0), o proporcional a la diferencia entre la entrada al controlador y el punto de consigna (valor 1).



**Figura 3.4.- Esquema de la pantalla de la estación del usuario en la que se configura el bucle de control n° 4 de uno de los controladores P100 del compartimento nitrificante.**

Además de la programación de las líneas de cada uno de los bucles, es necesaria la configuración de:

- Los datos auxiliares de cada uno los bucles (**figura 3.5.**).
- Las entradas analógicas (**figura 3.6.**) y las digitales.
- Los datos auxiliares de las entradas analógicas

Otras aplicaciones de este programa son:

- Lectura en línea de todos los valores que resultan de cada una de las líneas de los 16 bucles de control disponibles (8 por cada VCC).
- Lectura en línea del estado de las entradas y salidas digitales.
- Manipulación en línea de cada una de las líneas de los bucles de control así como de la configuración de las entradas analógicas (y de sus datos auxiliares) y digitales.

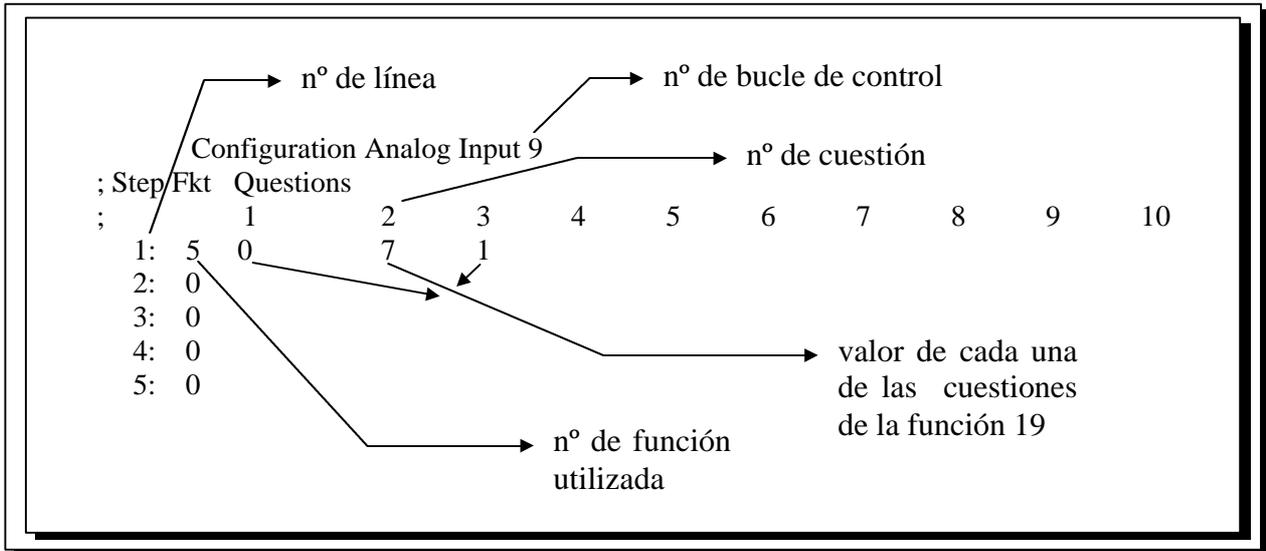


Figura 3.5.- Detalle de la pantalla de la estación del usuario en la que se configura la entrada analógica n° 4 de uno de los controladores P100 del compartimento nitrificante.

Auxiliary Data Loop 1

Value	Parameter	n° de bucle de control
0.30	Scan Time	0.00
0.00	P Gain	0.00
0.00	I Rep/Min	0.00
0.00	D Rate Min	0.00
0.00	Manual Reset	0.00
0.00	Gain Limit	0.00
0.00	S-P Ramp/Min	0.00
110	Dev Alarm Lo	0.00
100	Dev Alarm Hi	0.00
10.00	Dev Ind Lo	0.00
10.00	Dev Ind Hi	0.00
0.00	Loop Scale Lo	0.00
100	Loop Scale Hi	0
0.00	Output Limit Lo	0
100.00	Output Limit Hi	0.00
1000.00	Output Slew Closed	0
1000.00	Output Slew open	0.00
0.00	PV Alarm Lo	0.00
100	PV Alarm Hi	

Annotations:

- n° de bucle de control (points to Auxiliary Data Loop 1)

Figura 3.6.- Esquema de la pantalla de la estación del usuario en la que se configura los datos auxiliares del lazo de control n° 1 de uno de los controladores P100 del compartimento nitrificante.

### 3.3.2.2.- *La estación de sistema*

Los controladores P100, que por sí solos ya son autónomos, están subordinados a un control supervisor basado en programas elaborados en lenguaje C que integran la denominada General Purpose Station (GPS). Para comunicar estos dos sistemas existe un programa, que como ya se ha mencionado en el capítulo introductorio, recibe el nombre de MDC100 (INDUSTAR, M.I.C., Nanterre, Francia).

Este programa, que está instalado en la estación de sistema, y que consigue establecer comunicación entre los controladores P100, y con la estación GPS, debe tener configuradas una serie de variables, como son: puntos de consigna de los lazos de control, valores de las medidas de las principales condiciones de operación, etc.

Este programa tiene dos aplicaciones principales:

- a) manipulación de las principales variables de los lazos de control.
- b) a partir de una base de datos consigue dos aplicaciones diferentes:
  - b1) representaciones gráficas de la evolución de las variables que tiene almacenadas en la base de datos.
  - b2) establecer la comunicación de los controladores (P100) con la GPS.

### **La base de datos**

La base de datos está integrada por dos tipos de variables: las variables que serán almacenadas (variables transmitidas por los equipos de control a los programas de aplicación) y las variables que además de ser almacenadas permiten enviar instrucciones a los controladores (comandos). Dentro de cada uno de ellas se pueden diferenciar:

VARIABLES ALMACENADAS:

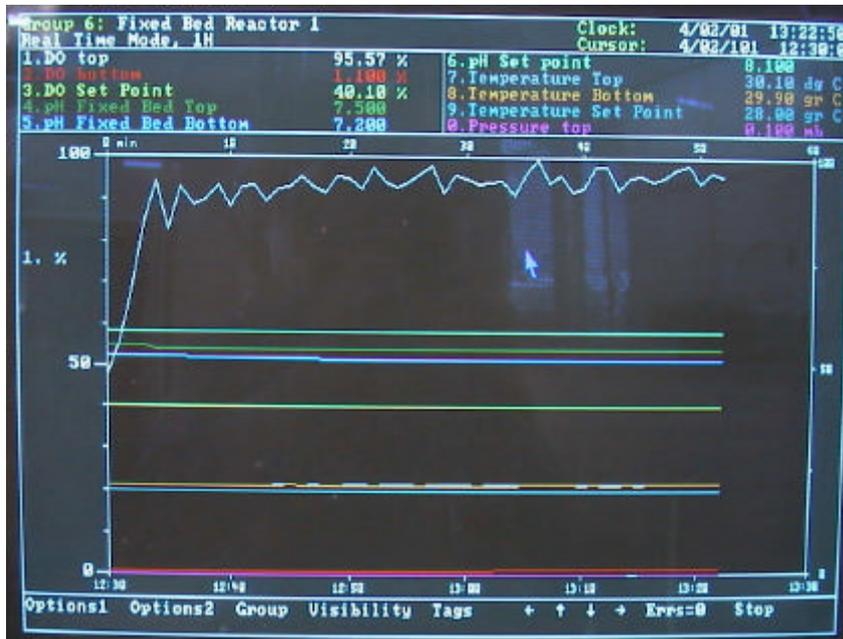
- digitales: de entrada (DI) y de salida (DO)
- analógicas: de entrada (AI), de salida (AO)

VARIABLES TIPO COMANDO (tanto comandos disponibles para el usuario, como los calculados):

- Comandos digitales: de salida (DO), comandos virtuales discretos (VD), interruptores internos (IS).
- Comandos analógicos: de regulación (LOOP), que incluye el valor de entrada al controlador (PV) y el punto de consigna (SPC). Además existe otro tipo de variables analógicas que reciben el nombre de LOC.

## Evolución de las variables con el tiempo

A partir de esta base de datos se han creado dos grupos de variables para poder realizar un seguimiento de la evolución de las variables de proceso con el tiempo (**figura 3.7.**).



**Figura 3.7.- Gráfico y datos correspondientes a uno de los grupos del compartimento nitrificante.**

## La comunicación con la GPS

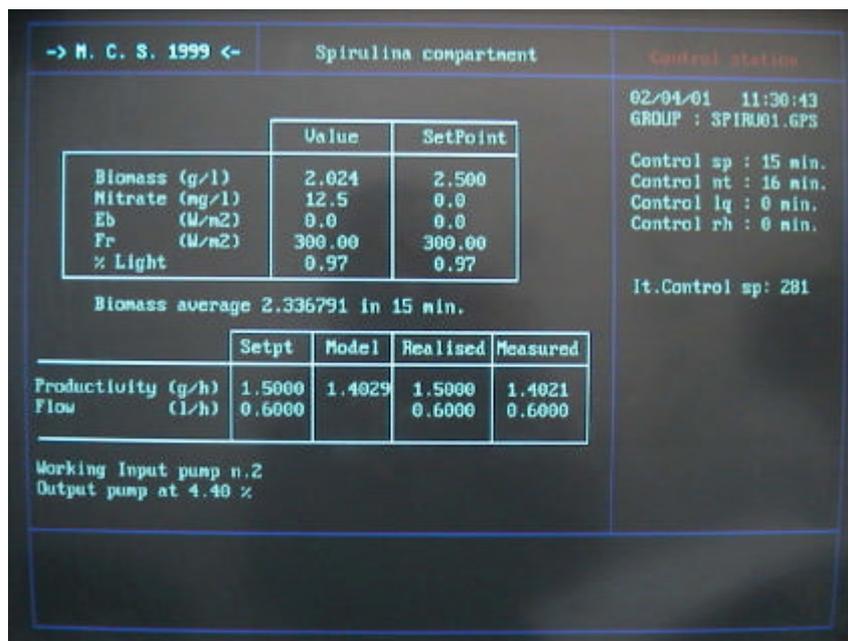
Para que sea posible la comunicación de esta estación de sistema con la estación GPS, se han definido un grupo de variables que contiene la información indispensable. Además, a partir de la definición de este grupo se puede realizar un seguimiento de la evolución de las principales variables de proceso en función del tiempo en la estación GPS (en la **figura 3.8.** se presenta una fotografía de uno de los menús de la estación GPS).

### 3.3.2.3.- Descripción de los lazos de control

Los lazos de control que se han desarrollado en el reactor piloto se describen a continuación y son los siguientes:

- Temperatura (**figura 3.9.**)
- pH (**figura 3.10.**)
- Oxígeno disuelto (**figura 3.11.**)
- Nivel de líquido (**figura 3.12.**)
- Presión (**figura 3.13.**)

En la descripción de cada uno de los lazos de control se presenta una tabla (**tablas 3.11., 3.12., 3.13., 3.14. y 3.15.**) en la que se incluye el objetivo del lazo de control, los elementos medidores, los actuadores, el tipo de controlador, los parámetros que se utilizan, el número de bucle en el que se encuentra el controlador, las alarmas de que dispone el sistema de control y las variables (analógicas y digitales) que están implicadas en el lazo de control.



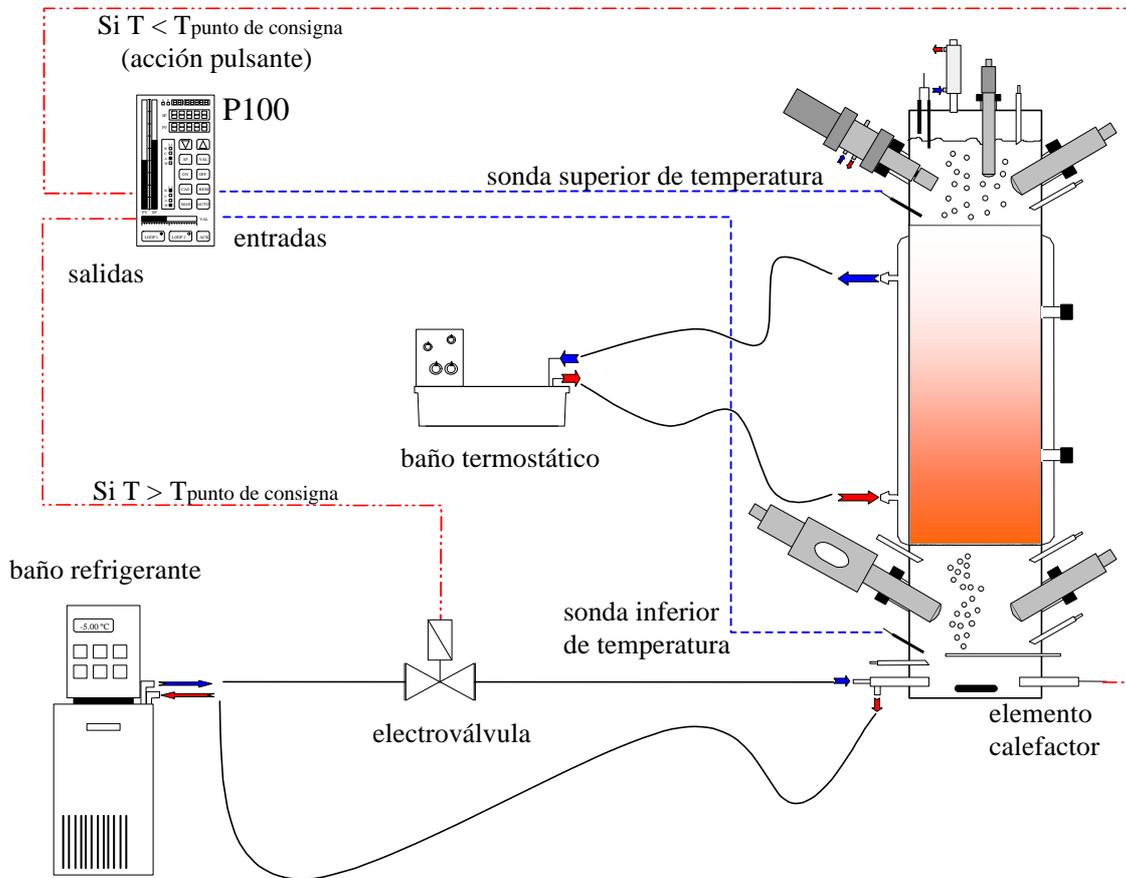
**Figura 3.8.-** La estación GPS. Una de las utilidades en la que se muestra información de uno de los compartimentos y el tiempo que resta hasta la siguiente acción de control para cada uno de los compartimentos.

## Control de temperatura

Tabla 3.11.- Descripción del lazo de control de la temperatura en el reactor piloto.

LAZO DE CONTROL	TEMPERATURA (bucle 7, VCC 3)	
<b>OBJETIVO</b>	Mantener la temperatura ponderada de la fase líquida del reactor en el punto de consigna, en un rango de [27.9 - 28.1] °C.	
<b>ELEMENTOS MEDIDORES</b>	Dos sondas miden la temperatura de la sección inferior y la sección superior del reactor. La medida que entra al controlador es una media ponderada: 80 % la sonda de la sección inferior, y 20 % la de la sección superior, esto es debido a que los elementos actuadores están situados en la sección inferior.	
<b>ACCIONES</b>	El controlador P100 actúa poniendo en marcha el elemento calefactor (acción en pulsos de frecuencia variable) o accionando la válvula del baño refrigerante (acción todo o nada). Controlador proporcional; $K_p = 100$ . Elemento calefactor: coeficiente de frecuencia = 1/16. Coeficiente de tiempo = 5. Rampa* = 0.5 mín <sup>-1</sup>	
<b>ALARMAS</b>	Alarmas de desviación del punto de consigna. Posibles causas: en el caso que existan problemas con el baño refrigerante o con el elemento calefactor. Si el baño refrigerante no funciona (posible alarma de desviación alta), el elemento calefactor y el sistema de filtración libre de biomasa deben desconectarse. Cuando aparezcan diferencias de temperatura entre la parte superior y la inferior del reactor superiores a 5 °C (esto sugiere posibles problemas con la agitación, la recirculación o la aireación), la bomba de entrada de medio se parará automáticamente.	
<b>VARIABLES ANALÓGICAS</b>	AI-0305	Medida de la temperatura (sección superior)
	AO-0306	Medida de la temperatura (sección inferior)
<b>VARIABLES DIGITALES</b>	DO-0321	Válvula del baño refrigerante
	DO-0322	Elemento calefactor

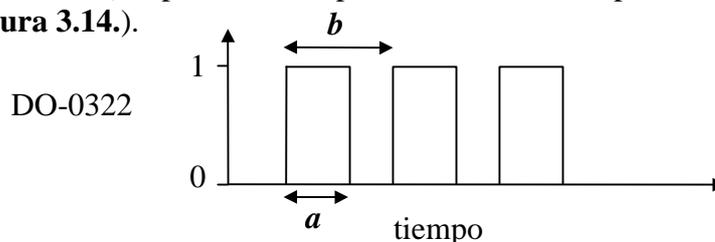
\* Rampa: el cambio en el punto de consigna del controlador proporcional de la temperatura se aplicará progresivamente.



**Figura 3.9a.- Esquema general del lazo de control de temperatura ( $T$  en el diagrama). El color azul indica señales eléctricas entre los sensores de proceso y los controladores (línea discontinua), mientras que el rojo indica señales eléctricas entre los controladores y los elementos actuadores (línea discontinua y punteada).**

Observaciones respecto al control de temperatura:

La acción de la válvula del baño refrigerante es ‘todo o nada’ ya que la respuesta del sistema a la perturbación que provoca este elemento actuador es lenta. En cambio la respuesta del sistema ante una perturbación del elemento calefactor era demasiado rápida, por lo que se introdujo una acción con pulsos. La acción del elemento calefactor (DO-0322) es pulsante con frecuencia variable. La frecuencia de la acción y la duración de la misma (que también es variable) dependen de la proximidad de la temperatura ponderada al punto de consigna (**figura 3.14.**).



**Figura 3.14.- Variación de la acción del elemento calefactor en el control de temperatura, donde  $a$  es el tiempo de acción del controlador y  $b$  a el tiempo sin acción del controlador.**

Donde  $a = 5 \cdot P_{temp}$  y  $b = \frac{1}{16} (P_{temp} + 1)$  ( $P_{temp}$  es la salida del controlador proporcional, y las unidades de  $a$  y  $b$  son segundos). La determinación de estos parámetros se realizó de modo empírico. La salida del controlador proporcional está acotada entre 0 y 1 (cuando se acciona el elemento calefactor); la salida será tanto más cercana a 1 cuanto más alejada del punto de consigna se encuentre la temperatura media.

En el esquema del lazo de control de la temperatura (figura 3.9), se puede ver que el controlador que se ha utilizado es incremental, es decir la salida del controlador varía entre -1 y +1, dependiendo si la diferencia de temperaturas entre la temperatura media y la temperatura del punto de consigna es mayor o menor que cero.

De forma adicional al sistema de control de temperatura mencionado, y para evitar de forma absoluta la posible aparición de gradientes de temperatura en la parte del reactor donde se encuentran las células inmovilizadas, ésta se dota de una camisa externa adicional, con circulación de agua termostalizada (véase figura 3.9a.).

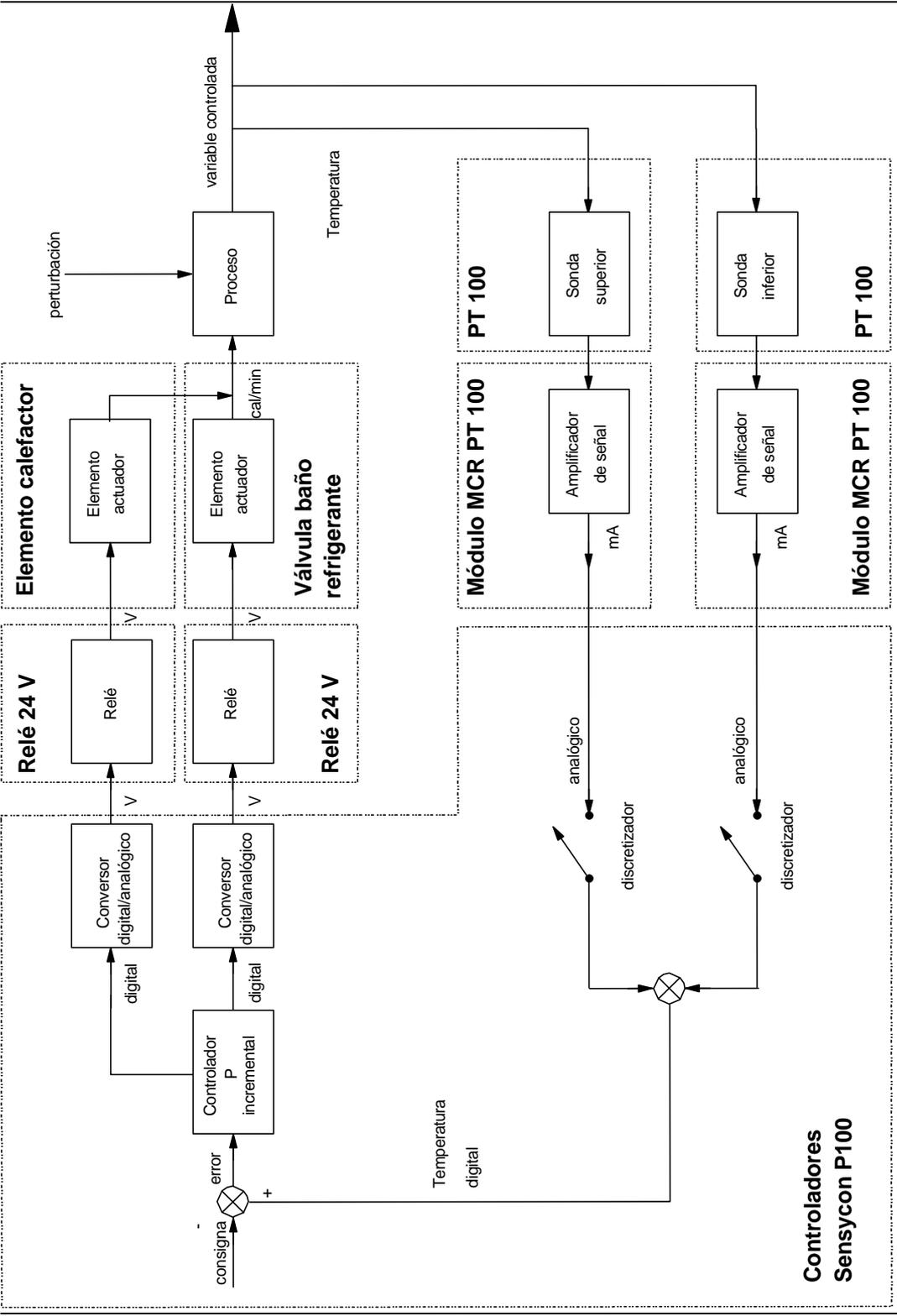
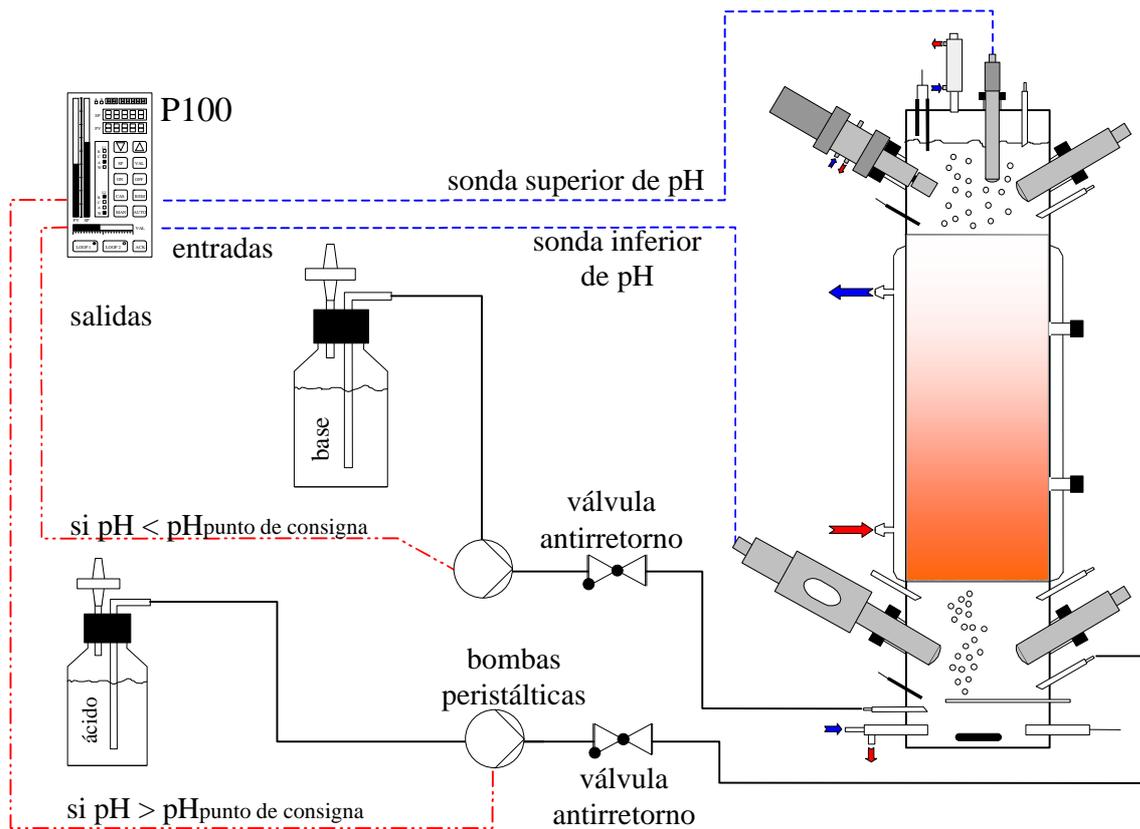


Figura 3.9b.- Diagrama del lazo de control de la temperatura.

## Control de pH

Tabla 3.12.- Descripción del lazo de control del pH en el reactor piloto del tercer compartimento.

LAZO DE CONTROL	pH (bucle 4, VCC 3)	
<b>OBJETIVO</b>	Mantener el pH promedio de la fase líquida del reactor en el punto de consigna (pH = 8.0), en un rango de [7.9 - 8.1], utilizando una banda muerta.	
<b>ELEMENTOS MEDIDORES</b>	Dos sondas miden el pH de la sección inferior y la sección superior del reactor. La medida que entra al controlador es una media ponderada: 90 % la sonda de la sección inferior, y 10 % la de la sección superior, así se evitan problemas de sobreimpulso ( <i>overshoot</i> ) en fases de transición debido a la lenta respuesta observada.	
<b>ACCIONES</b>	<p>El controlador P100 actúa poniendo en marcha la bomba de ácido o la bomba de base, así como, las velocidades de cada una de ellas. Debido a que el tiempo de respuesta es elevado y para minimizar la acción de control, se ha utilizado un tiempo muerto. El controlador actúa cada 30 minutos durante 40 segundos. Estos valores de frecuencia y de tiempo de duración de la acción se seleccionaron después de varias pruebas exhaustivas basadas en el tiempo de respuesta, en las que se utilizaron medio tamponado y las concentraciones de ácido y base utilizadas en el sistema de control.</p> <p>Controlador proporcional integral (PI) incremental; <math>K_P = 3</math>, <math>\tau_I = 1/50</math> min. Rampa = <math>0.3 \text{ min}^{-1}</math>.</p>	
<b>ALARMAS</b>	Alarmas de desviación del punto de consigna. Posibles causas: en el caso que se haya agotado el tanque de ácido o el tanque de base; o si las bombas de ácido/base tienen algún problema de funcionamiento.	
<b>VARIABLES ANALÓGICAS</b>	AI-0302	Medida del pH (sección superior)
	AI-0304	Medida del pH (sección inferior)
	AO-0401	Bomba de ácido
	AO-0402	Bomba de base
<b>VARIABLES DIGITALES</b>	DO-0421	Relé de la bomba de ácido
	DO-0422	Relé de la bomba de base



**Figura 3.10a.- Esquema general del lazo de control del pH. El color azul indica señales eléctricas entre los sensores de proceso y los controladores (línea discontinua), mientras que el rojo indica señales eléctricas entre los controladores y los elementos actuadores (línea discontinua y punteada).**

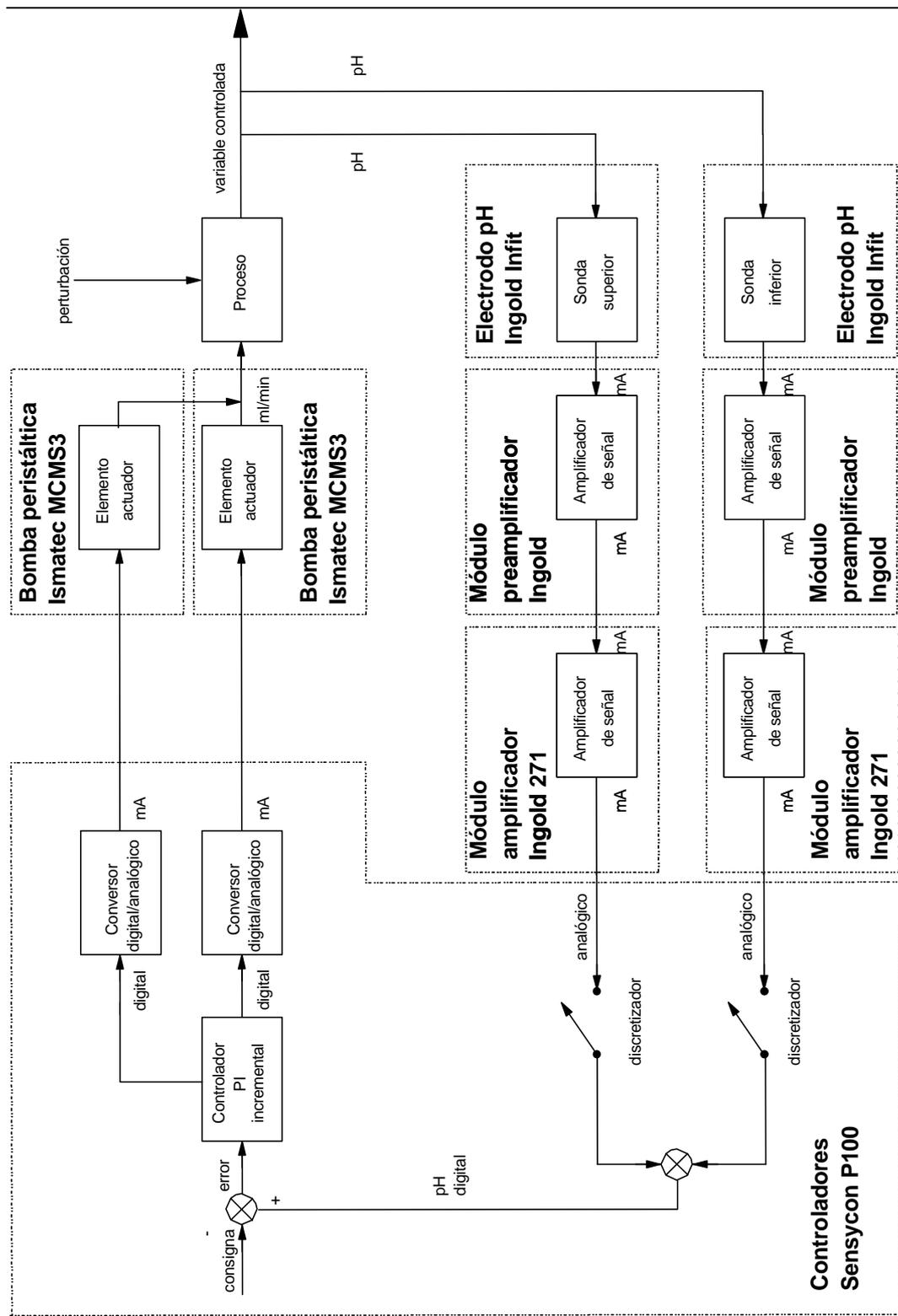
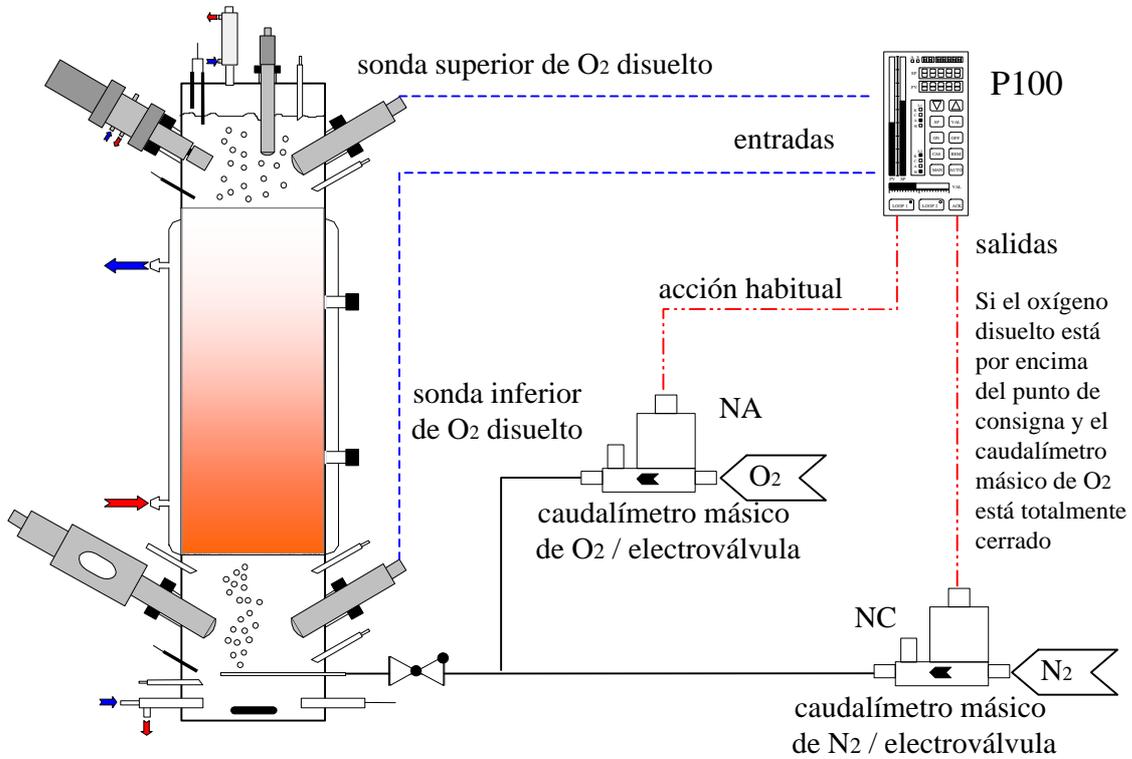


Figura 3.10b.- Diagrama del lazo de control del pH.

## Control de oxígeno disuelto

**Tabla 3.13.- Descripción del lazo de control del oxígeno disuelto en el reactor piloto del tercer compartimento.**

<b>LAZO DE CONTROL</b>	<b>OXÍGENO DISUELTO (bucle 3, VCC 3)</b>	
<b>OBJETIVO</b>	Mantener el oxígeno disuelto en el punto de consigna (80 %), en un rango máximo de [75 - 85] %.	
<b>ELEMENTOS MEDIDORES</b>	El oxígeno disuelto se mide mediante dos sondas (una en la sección inferior y otra en la superior). La media aritmética de las dos señales se utiliza como la entrada al controlador, ya que el tiempo de respuesta es relativamente rápido.	
<b>ACCIONES</b>	<p>El controlador P100 regula el caudal de oxígeno alimentado al reactor. La acción habitual es realizar una acción de control cuando el oxígeno disuelto medio es menor o mayor del 80 %. Sin embargo, cuando la válvula de control de O<sub>2</sub> está completamente cerrada y el valor de oxígeno disuelto en ese momento es mayor que el 80 %, el controlador puede ordenar una acción sobre la válvula de N<sub>2</sub>.</p> <p>Controlador proporcional integral derivativo (PID) incremental; <math>K_P = 12</math>, <math>\tau_I = 1/50</math> min; <math>\tau_D = 5</math> min. Rampa = 1.0 min<sup>-1</sup>.</p>	
<b>ALARMAS</b>	Alarmas de desviación del punto de consigna. Posibles causas: en el caso que se haya agotado la alimentación de O <sub>2</sub> o la de N <sub>2</sub> ; o si existen problemas con la agitación o con las válvulas de control.	
<b>VARIABLES ANALÓGICAS</b>	AI-0301	Medida de oxígeno disuelto (sección superior)
	AI-0303	Medida de oxígeno disuelto (sección inferior)
	AO-0303	Caudalímetro másico de O <sub>2</sub>
	AO-0403	Caudalímetro másico de N <sub>2</sub>
<b>VARIABLES DIGITALES</b>		



**Figura 3.11a.- Esquema general del lazo de control del oxígeno disuelto (NA: normalmente abierto; NC: normalmente cerrado). El color azul indica señales eléctricas entre los sensores de proceso y los controladores (línea discontinua), mientras que el rojo indica señales eléctricas entre los controladores y los elementos actuadores (línea discontinua y punteada).**

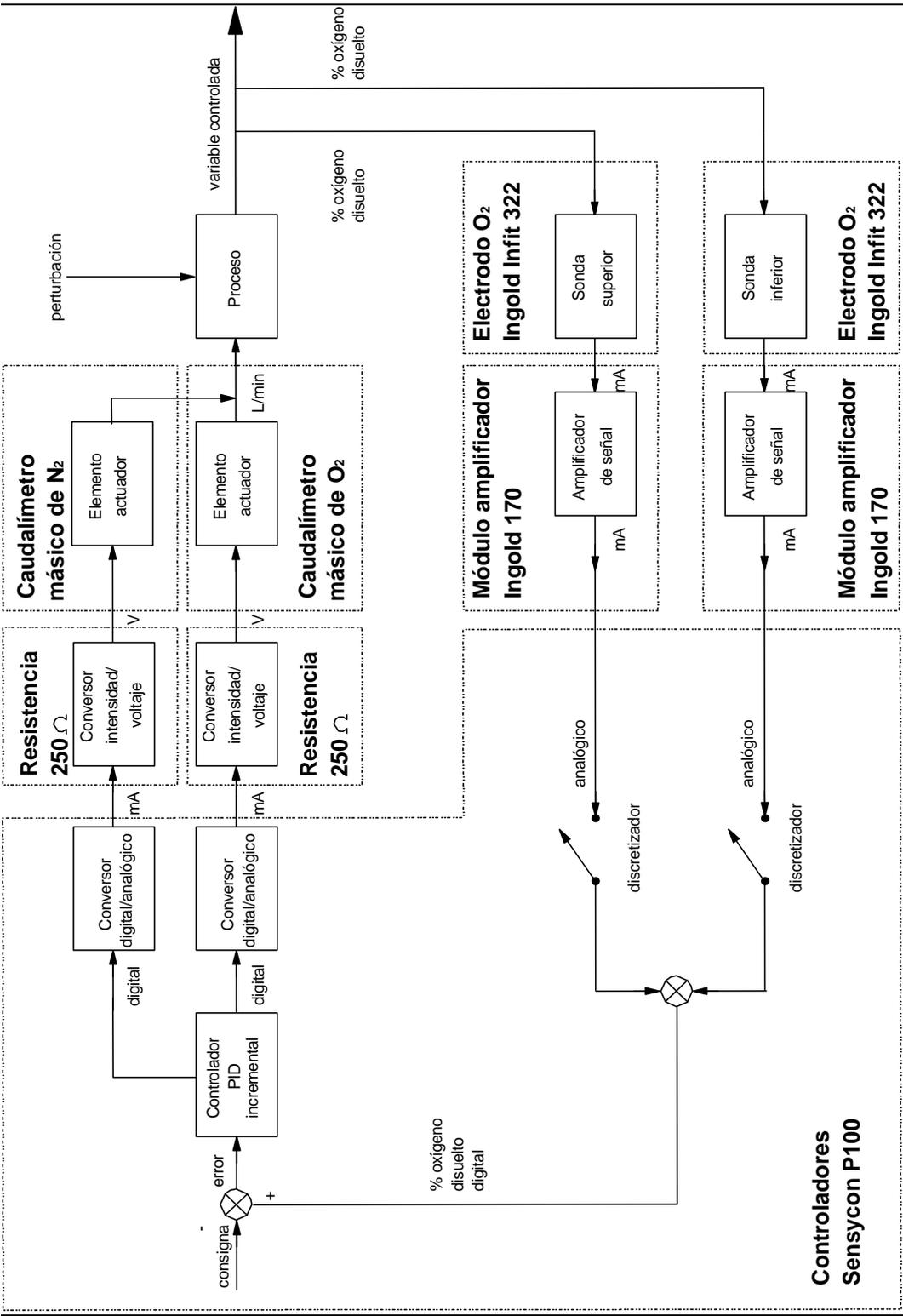
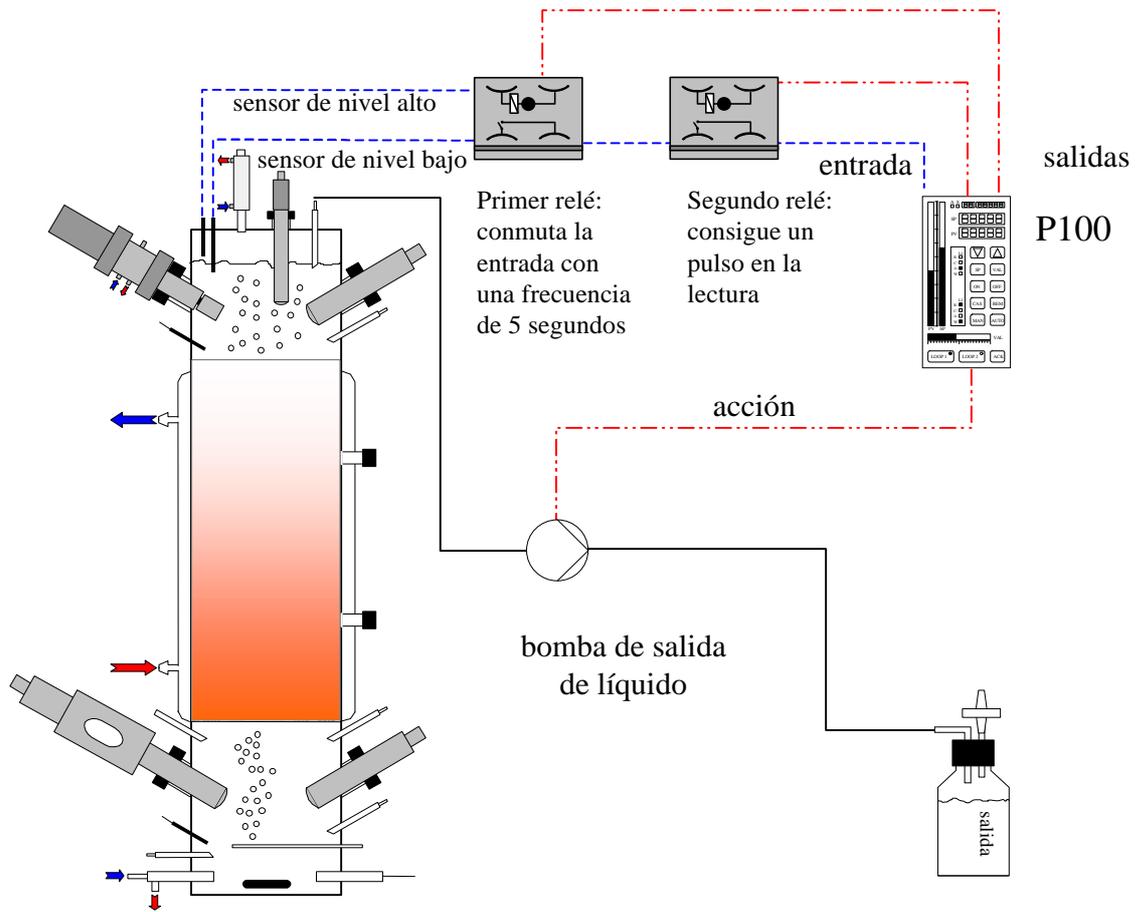


Figura 3.11b.- Diagrama del lazo de control del oxígeno disuelto.

**Tabla 3.14.- Descripción del lazo de control de nivel en el reactor piloto del tercer compartimento.**

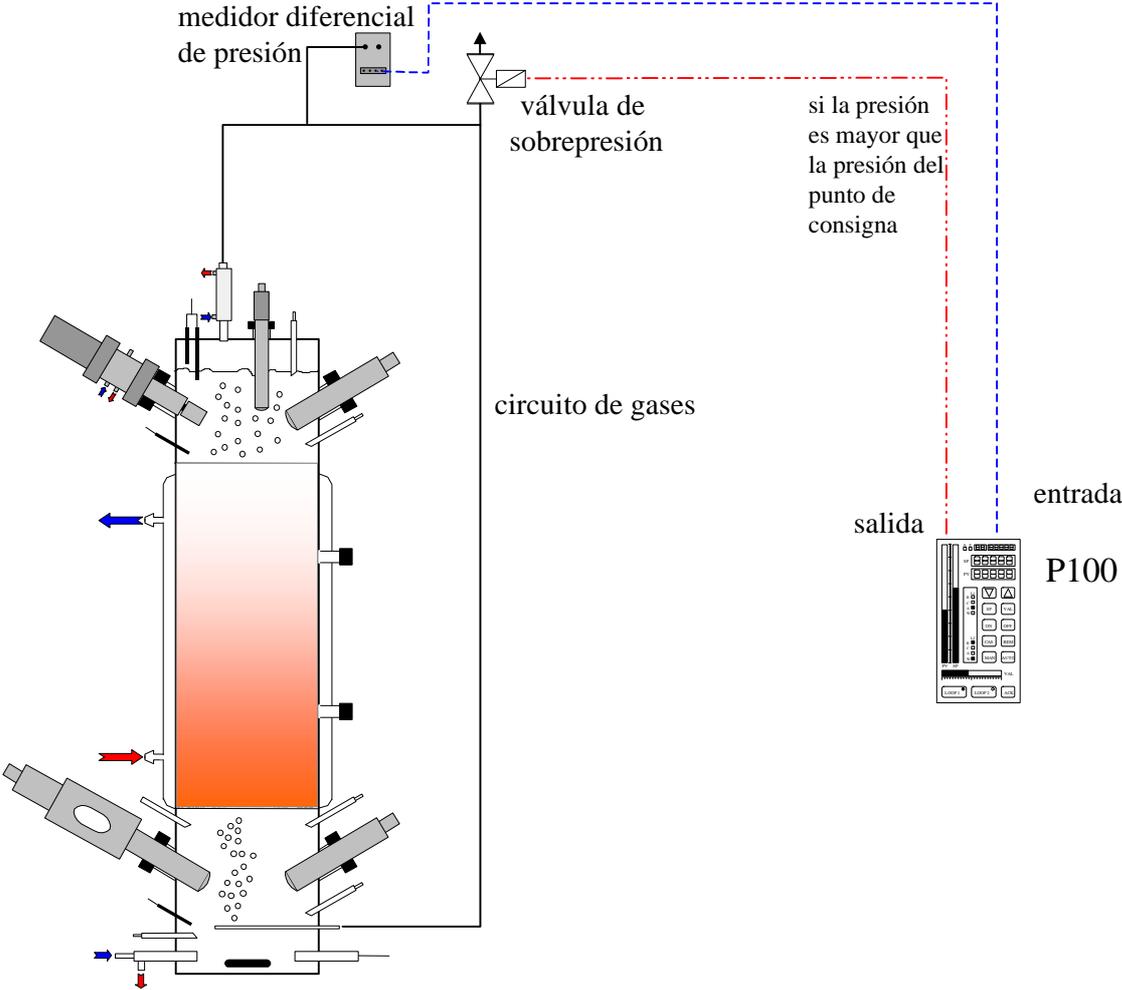
<b>LAZO DE CONTROL</b>	<b>NIVEL DE LÍQUIDO (bucle 5, VCC 4)</b>	
<b>OBJETIVO</b>	Mantener el nivel de líquido en el reactor dentro del rango determinado por los dos sensores de nivel. El lazo de regulación se implementa para evitar el desbordamiento del reactor. La tolerancia aproximada en el volumen es de $\pm 75$ mL.	
<b>ELEMENTOS MEDIDORES</b>	Se dispone de lecturas digitales (0 ó 1) de dos sensores (uno de nivel alto y otro de nivel bajo), según estén o no en contacto con la fase líquida. Se introducen dos relés, uno para conmutar la entrada del sensor de nivel alto o la del nivel bajo; el otro relé se añadió para obtener un pulso en la lectura, para evitar así producir interferencias a otras sondas y para prevenir el deterioro de los sensores debido a un proceso de electrólisis.	
<b>ACCIONES</b>	Existen tres casos: - El nivel de líquido está por debajo del nivel bajo, entonces, la velocidad de extracción de la bomba de salida de líquido se disminuye un 25 % respecto a la velocidad de la bomba de entrada de medio al reactor. - El nivel de líquido está entre el nivel bajo y el nivel alto, entonces, la bomba de extracción de líquido se mantiene a la misma velocidad que la bomba de entrada de medio al reactor. - El nivel de líquido está por encima del nivel alto, entonces, la velocidad de extracción de la bomba de salida de líquido se incrementa un 25 % respecto a la bomba de entrada de medio al reactor.	
<b>ALARMAS</b>	Cuando se detecta una señal de nivel alto durante cinco minutos, el sistema de extracción no está trabajando correctamente, entonces, la bomba de entrada de medio se para automáticamente.	
<b>VARIABLES ANALÓGICAS</b>	AI-0302	Bomba de salida de líquido
<b>VARIABLES DIGITALES</b>	DI-0425	Lectura del sensor de nivel (alto y bajo)
	DO-0423	Relé para seleccionar el sensor de nivel
	DO-0424	Relé para obtener un pulso en la lectura del sensor de nivel



**Figura 3.12.- Esquema general del lazo de control del control de nivel. El color azul indica señales eléctricas entre los sensores de proceso y los controladores (línea discontinua), mientras que el rojo indica señales eléctricas entre los controladores y los elementos actuadores (línea discontinua y punteada).**

**Tabla 3.15.- Descripción del lazo de control de presión en la cabecera del reactor piloto del tercer compartimento.**

<b>LAZO DE CONTROL</b>	<b>PRESIÓN (bucle 8, VCC 3)</b>	
<b>OBJETIVO</b>	Mantener la presión en el circuito de gases por debajo de un punto de consigna (80 mbar). Control de seguridad en el biorreactor.	
<b>ELEMENTOS MEDIDORES</b>	Un sensor de presión está conectado al circuito de gases del lecho fijo. Características: - Rango de 0 a 1000 mbar - Medida continua	
<b>ACCIONES</b>	El controlador P100 controla la abertura de la válvula cuando la presión está por encima del punto de consigna, para evitar sobrepresión en el reactor.	
<b>ALARMAS</b>	Cuando se detecta una sobrepresión continuamente, la válvula de sobrepresión no funciona o existe un problema de obstrucción de la línea de salida de gas.	
<b>VARIABLES ANALÓGICAS</b>	AI-0307	Presión de la fase gas en la cabecera del reactor.
<b>VARIABLES DIGITALES</b>	DI-0326	Comando de la electroválvula para la regulación de la presión.



**Figura 3.13.- Esquema general del lazo de control de presión. El color azul indica señales eléctricas entre los sensores de proceso y los controladores (línea discontinua), mientras que el rojo indica señales eléctricas entre los controladores y los elementos actuadores (línea discontinua y punteada).**

### 3.3.3.- Los reactores a escala laboratorio

Para agilizar el desarrollo de los estudios del proceso de nitrificación, se diseñaron tres reactores de lecho fijo a escala laboratorio, que permitirían el estudio simultáneo de diferentes factores, obteniéndose, de este modo, una mayor cantidad de información al poder realizar experimentos en paralelo en varios reactores. Por otra parte, estos reactores de nitrificación a escala laboratorio son utilizados también para los experimentos de conexión a escala laboratorio (como ya se ha comentado en el punto 1.2.5., conexión entre compartimentos).

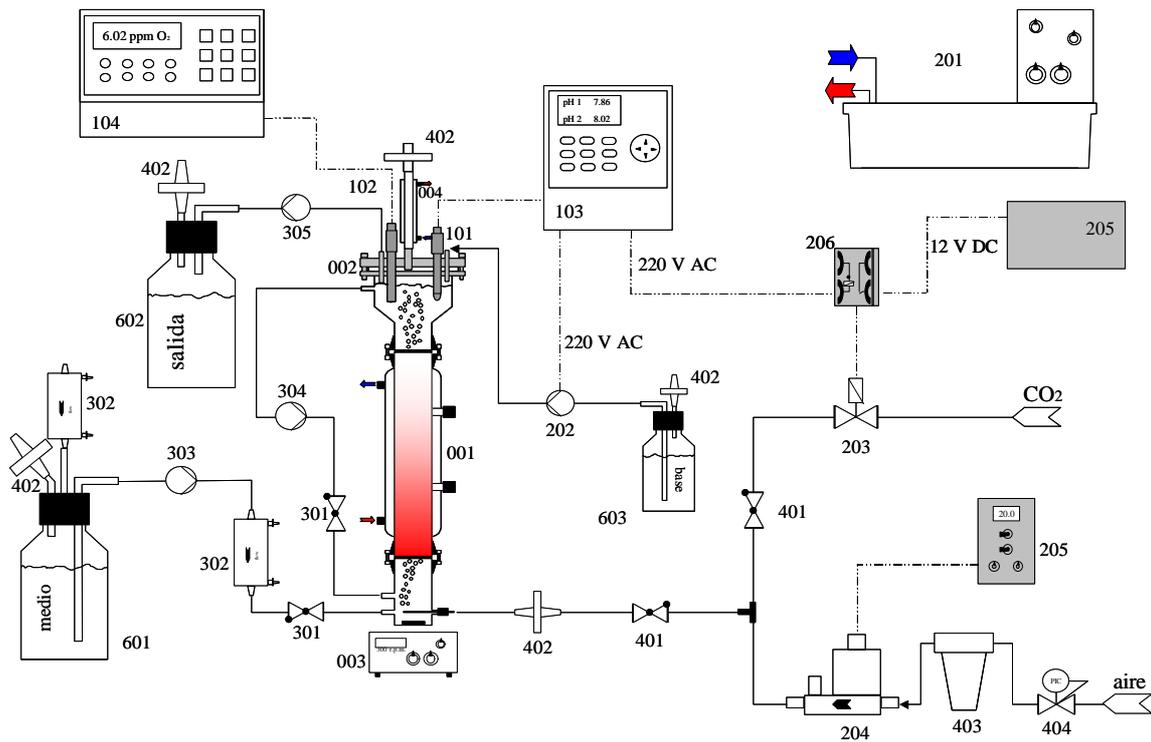
En el diseño de las columnas de nitrificación a escala laboratorio se ha intentado reproducir la misma configuración de reactor que en la escala piloto, teniendo en cuenta las limitaciones impuestas por la propia escala. Implantar exactamente la misma distribución de sondas y actuadores resulta imposible por el reducido tamaño del reactor.

Por otra parte, el soporte utilizado es idéntico al descrito para el reactor piloto, poseyendo, por tanto las mismas características físicas ya mencionadas en el apartado anterior (3.3.1.). El soporte se halla confinado a la zona central del reactor (lecho) mediante unas rejillas metálicas, que permiten el paso de líquido y gas, pero impiden que las partículas de soporte lleguen a las secciones contiguas.

Se presenta un esquema del diseño de estos biorreactores en la **figura 3.15.**, y una descripción de la instrumentación de que disponen en la **tabla 3.16.**

El volumen total aproximado de cada uno de los reactores de escala laboratorio es de 0.7 L. En el punto 4.2.1.1. del presente trabajo se presenta una descripción detallada de las dimensiones y de los volúmenes de cada una de las partes y fases.

Los reactores se esterilizan en dos etapas: la primera es mediante esterilización con vapor convencional, en la cual el soporte no se encuentra en el interior del reactor, y la segunda es también, al igual que en el caso del reactor piloto, una esterilización química. Una vez el reactor está estéril, se procede a introducir el soporte, proceso que se realiza en la cámara de flujo laminar. El soporte ha sido previamente esterilizado siguiendo el mismo protocolo descrito para el reactor piloto en el punto anterior (3.3.1.). Una vez el reactor contiene el soporte en su interior, se procede a una nueva esterilización química, tal y como también se ha descrito para el reactor piloto. No obstante, el tiempo de los ciclos de cada uno de los agentes esterilizantes se reduce a la mitad en el caso de los reactores a escala laboratorio.



**Figura 3.15.- El reactor a escala laboratorio y su instrumentación. Las referencias se detallan en la tabla 3.16.**

**Tabla 3.16.- Relación de los componentes de los reactores a escala laboratorio correspondiente a las referencias de la figura 3.15.**

Ref.	Material	Dimensiones/ características	Modelo/Marca/Origen
<b>REACTOR</b>			
001	Parte superior, central e inferior	Vidrio	Diseño propio, fabricado por Alco / Terrassa, España
002	Tapa	Acero inoxidable	Diseño propio, fabricado por Payra / Terrassa, España
003	Agitador magnético	150-1500 r.p.m.	Agimatc Rev-S / Selecta / Abrera, España
004	Condensador	Vidrio	Diseño propio, fabricado por Alco / Terrassa, España
<b>SENSORES</b>			
101	pH	12/120, esterilizable	InPro 3000/120 / Mettler Toledo / Urdorf, Suiza
102	Oxígeno disuelto	12/120, esterilizable	InPro 3000/120 / Mettler Toledo / Urdorf, Suiza
103	Medidor/controlador pH	2 canales	PHROCON 18 / Mettler Toledo / Urdorf, Suiza
104	Oxímetro de proceso		4500 / Mettler Toledo / Urdorf, Suiza

**Tabla 3.16. Continuación- Relación de los componentes de los reactores a escala laboratorio correspondiente a las referencias de la figura 3.15.**

	Material	Dimensiones/ características	Modelo/Marca/Origen
<b>ACTUADORES</b>			
201	Regulador de temperatura	Baño termostático para la camisa	Tectron Bio / Selecta / Abrera, España
202	Bomba peristáltica base	6 rodillos, dos canales	MCMS3 / Ismatec / Zürich, Suiza
203	Electroválvula	12V, 2.5 W	EN 3 / Sirai / Bussero, Italia
204	Caudalímetro másico aire / electroválvula	250 mL/min o 500 mL/min	F-2010-FA-33-V / Bronkhorst Hi-Tech / Ruurlo, Holanda
205	Módulo controlador del caudalímetro másico	2 canales	E-5714-AA / Bronkhorst Hi-Tech / Ruurlo, Holanda
<b>ELECTRÓNICA ADICIONAL</b>			
205	Fuente de alimentación		U1413 (P.Fontaine Électronique)
206	Relé	220 V, 7A	Matsushita / Mei, Japón
<b>CIRCUITO DE LÍQUIDO</b>			
301	Válvula antirretorno (caldo de cultivo / medio)	Acero inoxidable, esterilizable	Hoke / Creskill, N.J. USA
302	Filtro	0.22 µm	Opticap Filter / Millipore / Bedford, MA, USA
303	Bomba peristáltica entrada de medio	8 rodillos, 2 canales, para tubo con topes	Reglo analog, MS 2/8 / Ismatec / Zürich, Suiza
304	Bomba peristáltica recirculación	6 rodillos, 2 canales	MCMS3 / Ismatec / Zürich, Suiza
305	Bomba peristáltica extracción (salida)	6 rodillos, 2 canales	T1A / Ismatec / Zürich, Suiza
--	Conducciones	Tubo flexible	Norprene / Ismatec / Zürich, Suiza
--	Tubos bomba peristáltica	Esterilizables, larga duración, con topes	Pharmed / Ismatec / Zürich, Suiza
<b>CIRCUITO DE GASES</b>			
401	Válvula antirretorno	De conexión rápida, para tubo de 6 mm	H-QS-6 / Festo / Esslinger, Alemania
402	Filtro aire	0.22 µm	Millipore / Bedford, MA, USA
403	Filtro aire		Headline Filters / Maidstone, UK
404	Manorreductor con manómetro	1-5 bar	Festo / Esslinger, Alemania
--	Conducciones	Tubo rígido, poliamida; DN 6	6x4 / Mazzernew / Italia
--	Conexiones rápidas	Para tubo de 6 mm	Legris / Rennes, Francia
<b>TANQUES</b>			
601	Entrada de medio	20 L	Nalgene, Hereford, UK
602	Salida	20 L	Nalgene, Hereford, UK
603	Base	1 L	Pyrex/ Francia

### 3.3.4.- Control en los reactores a escala laboratorio

Los reactores a escala laboratorio disponen de un sistema de control que es mucho menos sofisticado, y cubre un menor número de variables que en el caso del reactor piloto. Las variables controladas en estos biorreactores son las siguientes:

- **Temperatura:** el lecho está encamisado, y mediante un baño termostático se controla la temperatura del reactor. No existe ninguna sonda de temperatura en el interior del reactor, a excepción de la que está integrada en el electrodo de oxígeno disuelto (InPro 3000/120, Mettler Toledo, Urdorf, Suiza).
- **pH:** el pH del reactor se mide en la sección superior y se controla mediante la adición de ácido ( $\text{CO}_2$  gas) o base ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 100 g/L). La acción habitual del reactor es añadir base, ya que durante el proceso de nitrificación biológica existe una producción neta importante de protones, que acidifican el medio de cultivo, y que desviarían el pH del valor óptimo requerido para el proceso. No obstante, en ciertos casos en los que el reactor esté operando a baja carga y sobre todo en la puesta en marcha, es necesaria la adición de ácido, ya que la aeración arrastra cierta cantidad de dióxido de carbono, desplazando el equilibrio, y haciendo aumentar, consecuentemente, el pH en el reactor. Para la acidificación del medio se ha seleccionado el dióxido de carbono gas debido fundamentalmente a dos razones: la primera es que la variación de volumen que comporta en el reactor es muy poco importante, y la segunda, es que la acidificación se produce a lo largo de todo el reactor, facilitando, de este modo, una rápida homogeneidad de la fase líquida.
- **Caudal de aire:** el caudal de aire al reactor se controla mediante caudalímetros máscicos (Bronkhorst Hi-Tech / Ruurlo, Holanda). El oxímetro de proceso (4500, Mettler Toledo, Urdorf, Suiza) permite conocer el valor en línea del oxígeno disuelto en la cabecera del reactor. Sin embargo, esta variable, el oxígeno disuelto no es controlada.

---

## 3.4.- Caracterización física de los biorreactores

---

### 3.4.1.- Metodología empleada para el estudio del grado de mezcla

El estudio del grado de mezcla de un reactor se suele llevar a cabo mediante un análisis de la distribución del tiempo de residencia (DTR), que ha sido la técnica empleada en los experimentos realizados. Este tipo de medida se determina utilizando la técnica de estímulo-respuesta. Este método requiere la introducción de un material trazador en la entrada o en algún punto del interior del reactor, y la observación de la consiguiente respuesta en la corriente de salida del reactor o en otro punto en el interior del reactor. La distribución del tiempo de residencia se obtiene a partir de la curva de respuesta y entonces, es posible seleccionar un modelo apropiado de flujo que represente correctamente el comportamiento experimental del reactor (Levenspiel, 1972).

Existe un gran número de sustancias que pueden ser utilizadas como trazadores en este tipo de experiencias. En general, el trazador elegido debe cumplir las siguientes condiciones: debe ser soluble sólo en una fase, se debe disponer de un método de detección sensible y de un equipo con una elevada capacidad de resolución y por último, el trazador elegido debe ser inerte (que no produzca reacción con la fase y que no afecte a los procesos biológicos).

El uso de colorantes proporciona una valiosa información visual de la presencia de trazador; sin embargo, los detectores colorimétricos pueden dar respuestas no lineales a bajas concentraciones. Esto complica la medida de la curva de DTR, en su totalidad, especialmente, si existen zonas muertas en el reactor (Swaine *et al.*, 1988).

La introducción del trazador se realiza, comúnmente, mediante funciones de tipo escalón o funciones en pulso, aunque también existen otros tipos de funciones más complejas (armónicas, estocásticas,...). El tipo de función seleccionado ha sido el de pulso.

Se utilizó azul de dextrano como trazador. Su elevado peso molecular ( $2 \cdot 10^6$  g/mol) evita que penetre en el interior de las partículas de poliestireno. Este compuesto es fácil de detectar y analizar por absorbancia a 618 nm. El calibrado que relaciona la concentración de azul de dextrano con la absorbancia a dicha longitud de onda, se presenta en el apéndice.

### **3.4.2.- Metodología empleada para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia de la fase gas a la líquida ( $K_{La}$ ) para el oxígeno.**

En reactores aerobios, se debe suministrar un nivel de oxígeno al medio de cultivo para conseguir unas condiciones óptimas para el crecimiento aerobio. A menudo, la velocidad de transferencia de oxígeno es un factor limitante en un biorreactor y un importante parámetro en el escalado. Por otra parte, la transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida es una de las variables limitantes en la operación de los sistemas de nitrificación con biomasa inmovilizada a modo de biofilme (Wijffels, 1994). La velocidad de transferencia de oxígeno es dependiente del coeficiente individual de transferencia de materia,  $k_{La}$  y de la fuerza impulsora,  $(C^i - C)$  (donde  $C$  es la concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida y  $C^i$  es la concentración de la interfase gas-líquido) (Dunn y Einsele, 1985).

La velocidad de transferencia de oxígeno puede ser medida mediante técnicas químicas o físicas. Una técnica física, habitualmente, implica realizar un escalón en la concentración de oxígeno en la entrada de gas al reactor y medir la concentración de oxígeno disuelto. Primero se establece el estado estacionario mediante la introducción de aire o nitrógeno y luego se substituye por nitrógeno o aire (respectivamente). Una variante de este método es el método de la presión dinámica, en el que la presión en el interior del biorreactor se aumenta, causando un aumento instantáneo de la concentración de oxígeno en la interfase gas-líquido. Aunque estos métodos físicos pueden ser aplicados a biorreactores, requieren una medida independiente de caudal volumétrico de consumo de

oxígeno por los microorganismos en el reactor o una determinación precisa de concentración de oxígeno en la interfase gas-líquido (van't Riet, 1979).

Por otra parte, para el caso de gases muy poco solubles como el oxígeno se puede considerar como válida la aproximación:

$$k_L a \approx K_L a$$

Es decir que el coeficiente individual de transporte se puede considerar igual al valor del coeficiente global (Lee, 1985). Por tanto es posible trabajar con la concentración de saturación (equilibrio) en vez de utilizar la concentración de oxígeno en la interfase gas-líquido.

### *El método “gas out-gas in”*

El método “gas out-gas in” es otro método dinámico que determina de forma directa el coeficiente volumétrico de transferencia de materia en el caldo de cultivo. Se basa en la medida de la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Si el aporte de gas al biorreactor se interrumpe, la concentración de oxígeno disuelto disminuirá a igual velocidad a la del consumo de oxígeno por parte de los microorganismos. De la evolución de la medida del oxígeno disuelto se puede determinar el consumo de oxígeno (si la velocidad de consumo es independiente de la concentración del oxígeno disuelto, ésta disminuye linealmente con el tiempo). Cuando se introduce gas de nuevo, la concentración de oxígeno disuelto aumentará hasta el nivel inicial, y utilizando el valor estimado del consumo de oxígeno, se puede determinar el valor de  $K_L a$  del perfil de medidas de oxígeno disuelto (van't Riet, 1979).

Todos los métodos físicos de determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno mediante sonda de oxígeno son poco precisos cuando la constante de tiempo de respuesta ( $\tau$ ) de la sonda de oxígeno es relativamente elevada. La constante de tiempo de respuesta se define como el tiempo en el que la sonda alcanza el 63.2 % de su valor final cuando se expone a un cambio en escalón de la concentración. Para obtener valores precisos, se recomienda el uso del criterio:  $\tau < 1/K_L a$  (van't Riet, 1979). Las sondas de oxígeno esterilizables comerciales poseen una constante de tiempo de respuesta grande: 10-100 s. Se han desarrollado varios modelos para la respuesta de la sonda, pero la mayoría de las sondas esterilizables actuales se pueden aproximar a un sistema de primer orden con resultados satisfactorios.

El método dinámico se puede aplicar también a sistemas sin reacción. Esto resulta interesante cuando se estudia la influencia de los parámetros de operación (velocidad de agitación, caudal de gas, velocidad de reacción, etc.) en el coeficiente volumétrico global de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ).

### *El método del sulfito*

En cuanto a los métodos químicos, el método más clásico es el conocido como método del sulfito (Lee, 1985). Este método permite determinar la velocidad de consumo de oxígeno mediante valoración. Para utilizar este método es necesario llenar el reactor con una solución de sulfito de sodio y evaluar el descenso en la concentración de sulfito de sodio en función del tiempo. La reacción que tiene lugar es la siguiente:



En determinadas condiciones esta reacción es de orden cero respecto al sulfito de sodio y la velocidad de oxidación del sulfito es constante e igual a dos veces la velocidad de consumo de oxígeno. Por tanto, la variación de la concentración del sulfito de sodio respecto al tiempo es linealmente decreciente.

Por otra parte, el balance de materia para el oxígeno en la fase líquida, considerando que tanto la fase gas como la fase líquida son perfectamente homogéneas (tienen mezcla perfecta) es el que se plantea en la **ecuación 3.1**.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) - r_{O_2} \quad (3.1)$$

Siendo:

$r_{O_2}$  = la velocidad de consumo de oxígeno ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )

$C$  = concentración de oxígeno en la fase líquida ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$C^*$  = concentración de oxígeno de saturación de la fase líquida ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$K_L$  = coeficiente global de transferencia para el oxígeno ( $\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ )

$a$  = es el área específica de intercambio de transferencia de materia (área de interfase o área interfacial) por unidad de volumen de líquido ( $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ )

Teniendo en cuenta la baja solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo y que la reacción es suficientemente rápida, se puede considerar que el oxígeno se consume “instantáneamente”, pudiendo asumir que  $dC/dt$  es cero. Por tanto, la expresión del balance de la ecuación 3.1., quedaría reducido a la **ecuación 3.2**.

$$r_{O_2} = K_L a (C^* - C) \quad (3.2)$$

La reacción descrita se cataliza mediante la adición de iones cobalto. Utilizando este catalizador a una concentración inferior a  $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  es posible considerar que todo el oxígeno disuelto es consumido. Por tanto, la concentración de oxígeno en el líquido es cero ( $C = 0$ ). De este modo, la expresión restante para el  $K_L a$ , es la descrita en la **ecuación 3.3**.

$$K_L a = \frac{r_{O_2}}{C^*} \quad (3.3)$$

El balance de materia para el oxígeno en el biorreactor y la expresión de concentración de saturación para el oxígeno se detallan en las **ecuaciones 3.4. a 3.9**.

$$G_e y_e - G_s y_s = r_{O_2} V \quad (3.4.)$$

$$y_s = \frac{A}{1+A}; \text{ donde, } A = \frac{y_e - r_{O_2} \frac{V}{G_e}}{1 - y_e} \quad (3.5. \text{ y } 3.6.)$$

$$C^* = \frac{y_{O_2} P_t}{H}; \text{ donde, } y_{O_2} = \frac{y_e - y_s}{\ln \frac{y_e}{y_s}} \quad (3.7. \text{ y } 3.8.)$$

$$K_L a = \frac{r_{O_2}}{C^*} \quad (3.9.)$$

Donde:

$V$  = volumen de reactor (L)

$y_e$  = fracción molar de oxígeno en la fase gas de la corriente de entrada al reactor

$y_s$  = fracción molar de oxígeno en la fase gas de la corriente de salida del reactor

$G_e$  = caudal de gas de entrada (mol/h)

$G_s$  = caudal de gas de salida (mol/h)

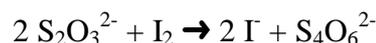
$H$  = constante de Henry (Pa·L/mol)

$P_t$  = presión total en el biorreactor (atm)

La velocidad de consumo de oxígeno ( $r_{O_2}$ ) se determina mediante la valoración de las diferentes muestras extraídas del reactor en función del tiempo. Las muestras se extraen en atmósfera inerte (nitrógeno gas) y se vierten sobre yodo, de forma que la reacción que se produce es la siguiente:



A continuación se procede a la valoración del exceso de yodo mediante tiosulfato:




---

### 3.5.- Otros equipos utilizados

---

Espectrofotómetros:

- CADAS 100, Dr. Lange, Düsseldorf, Alemania.
- UVIKON 941, Kontron Instruments, Milán, Italia

Microscopio óptico: AXIOSKOP, Zeiss, Berlín, Alemania.

Cámara de vídeo (instalada en el microscopio óptico): PROTEK JAI 2060, Ili, Japón.

Autoclaves:

- Varioklav 400, Alemania
- AUTESTER-E, Selecta, Abrera, España

Cámara de flujo: BH-10, Telstar, Terrassa, España.

Centrífuga: J2-21M/E, Beckman Instruments, Mijdrecht, Holanda.

Estufas:

- JOUAN, Astel, Liège, Bélgica.
- BKE 40, Memmert, Schwabach, Alemania

Liofilizador: BENCHTOP 5L, Virtis Company, New York, USA

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---

### 4.1.- Cultivos en suspensión

---

La familia *Nitrobacteraceae*, se caracteriza por un lento crecimiento, tanto es así, que el tiempo estimado habitual para el desarrollo de cultivos en erlenmeyer es de alrededor de 1-4 meses, siempre dependiendo de la concentración inicial de la suspensión (Watson *et al.*, 1980). Aunque la velocidad en la oxidación de amonio o nitrito es relativamente rápida, no ocurre lo mismo con el crecimiento celular, como ya se ha descrito en la introducción. Para detectar la nitrificación se acostumbra a utilizar rojo de fenol como indicador de pH. El viraje de éste a color amarillo (pH ácido) indica que se está produciendo la nitrificación, y es el momento de ajustar el pH a un valor adecuado (en torno a 8), habitualmente mediante la adición de carbonato de sodio. La utilización de carbonato de sodio tiene una doble misión: actuar como base ajustando el pH, y además, asegurar la presencia de fuente de carbono en el medio.

En cultivos en erlenmeyer, un indicador macroscópico habitual del crecimiento celular es la turbidez de la suspensión. Este principio aplicable a gran número de microorganismos, se transforma en una herramienta inútil en el caso de las bacterias nitrificantes (al menos en el caso de cultivos en suspensión sobre medio autótrofo), aunque, por otra parte, incluso a bajas densidades celulares la velocidad de nitrificación es realmente importante.

De los hechos comentados anteriormente se desprende la dificultad de obtener cultivos con densidad celular apreciable, si el punto de partida es un inóculo con escasa concentración de células (que es el caso de los viales suministrados por la ATCC). La concentración celular inicial es pues, un parámetro clave para el crecimiento, sobre todo en el caso del género *Nitrosomonas* (Wijffels, 1994).

El objetivo principal de estos cultivos en suspensión es pues la de obtener un inóculo con volumen y concentración suficientes que permita la puesta en marcha de los reactores de lecho fijo, tanto a escala laboratorio como a escala de planta piloto.

#### 4.1.1.- Cultivos en erlenmeyer

##### a) *Nitrosomonas europaea*

De la ATCC se recibieron dos tubos de ensayo, que contenían aproximadamente 5 mL de suspensión celular acuosa por tubo. El contenido de cada uno de estos tubos se vertió en un erlenmeyer de 25 mL y se añadió en cada uno 5 mL de medio fresco (la composición del medio se especifica en el capítulo *Materiales y Métodos*). Además, se sembraron dos placas de Petri (el medio de estas placas es el medio de cultivo ya detallado en el apartado 3.1. y agar (20 g/L); la dimensión de estas placas es de 5 cm de diámetro).

Los erlenmeyers y las placas se incubaron a 27 °C (sin agitación y sin aporte de oxígeno). Los erlenmeyers se recubrieron con papel de aluminio para mantener la total oscuridad en los cultivos (ya se ha comentado en el capítulo introductorio la fotoinhibición que sufren estas bacterias).

A las placas se les añadía medio fresco (una o dos gotas) periódicamente, para impedir la deshidratación del agar. Incluso después de varios meses, no se observaron colonias en las placas.

Regularmente se realizaban observaciones microscópicas de las muestras de los cultivos en erlenmeyer y análisis de las concentraciones de amonio y nitrito. Aunque, inicialmente, hasta alcanzar volúmenes de cultivo de 25 mL aproximadamente, no se realizaron análisis de amonio y nitrito, ya que el volumen necesario era demasiado grande con relación al volumen total del cultivo. En esta primera fase del crecimiento se utilizaba el indicador de pH rojo de fenol para detectar la oxidación de amonio, ajustándose periódicamente el pH con carbonato de sodio.

Periódicamente se añadían pequeñas cantidades de medio fresco a los cultivos y después de tres meses aproximadamente, se obtuvo la cantidad suficiente para proceder a realizar un cultivo mixto de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* en erlenmeyer.

##### b) *Nitrobacter winogradskyi*

Se recibió esta cepa liofilizada de la ATCC. Después de resuspenderla en medio fresco (la composición del medio de recuperación se detalla en el capítulo *Materiales y métodos*), se depositó esta suspensión en un erlenmeyer de 25 ml. Se sembraron también dos placas de Petri, la concentración de agar era la misma que en el caso anterior, pero, en este caso, el medio utilizado era el medio mixotrófico que se describe en el capítulo *Materiales y Métodos*.

Después de una semana, se añadió al cultivo en erlenmeyer el medio mixotrófico. Después de dos días, el crecimiento del cultivo se apreciaba a simple vista. Cada tres días se añadía medio fresco (la mitad del volumen del cultivo) y rápidamente se pudo trabajar con erlenmeyers de volumen mayor. Durante este tiempo, se controlaba el pH a partir del indicador rojo de fenol y se trataba de mantenerlo entre 7.5 - 8. Además, se realizó un seguimiento de las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ .

Simultáneamente, algunos de los cultivos se realimentaron con medio inorgánico (la composición se detalla en el capítulo *Materiales y Métodos*), lo que disminuyó de forma notable la velocidad de crecimiento.

Una vez las bacterias se adaptaron al cambio de composición de medio, se detectó una recuperación en la velocidad de degradación de nitrito, aunque a niveles que no son comparables a las velocidades de degradación en presencia de una fuente orgánica de carbono. Después de unos dos meses desde que se iniciaron los cultivos en medio mixotrófico, se disponía de una cantidad suficiente para proceder a realizar un cultivo mixto de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi*.

En cuanto a las siembras en placa, se observó un crecimiento relativamente rápido (en comparación con el de *Nitrosomonas*) y se procedió a una resiembra periódica (cada uno o dos meses).

### c) Cultivos mixtos

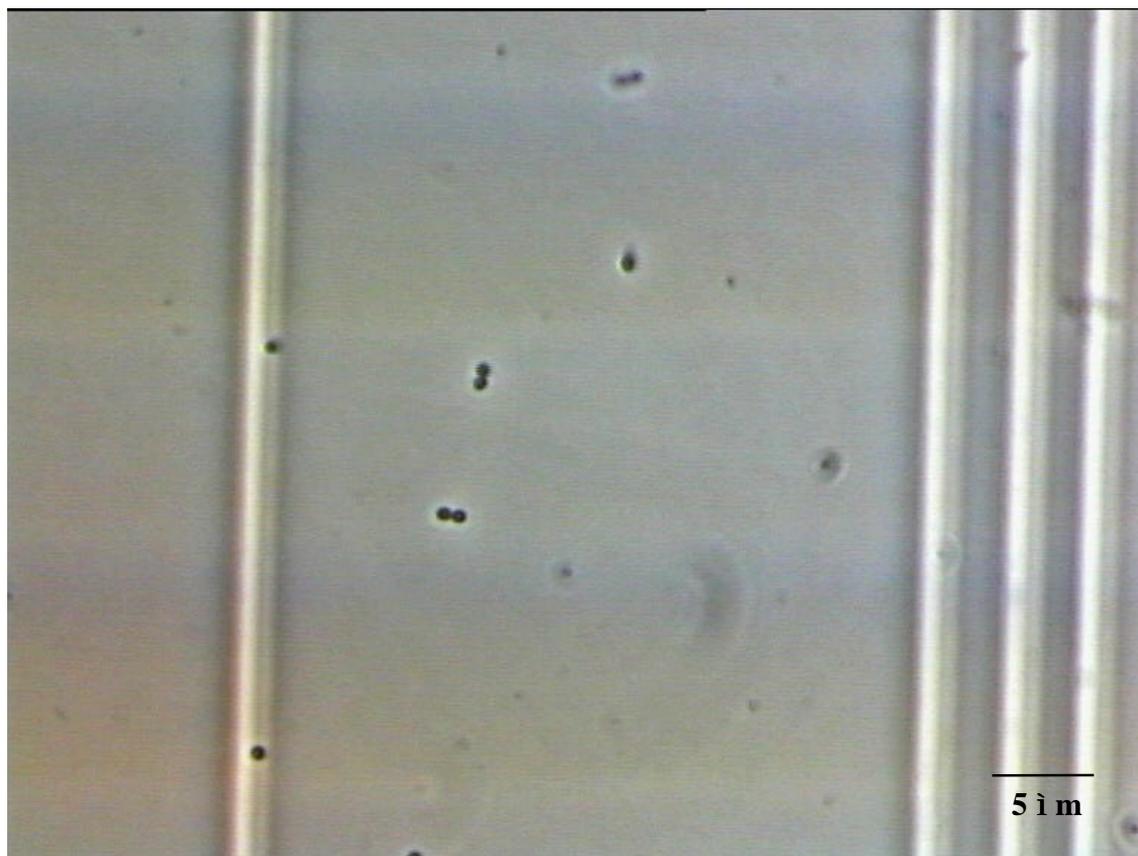
Cuando se dispuso de una cantidad suficiente de *Nitrosomonas* y de *Nitrobacter* creciendo en medio autótrofo, se procedió a iniciar un cocultivo en erlenmeyer.

A partir de muestras que se extraían regularmente de los cultivos se determinaban las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ . Así, se determinaba cuándo era conveniente añadir medio fresco. Se medía el pH con ayuda de papel indicador y se añadía carbonato de sodio a los cultivos cuando el pH era menor a 7.5. Además, se realizaban observaciones microscópicas (**figura 4.1.**) para averiguar si aparecía algún tipo de contaminación celular.

Después de unos tres meses se disponía de cantidad suficiente para inocular un cultivo de 1 L en biorreactor. Es decir, que desde del inicio de los cultivos fueron necesarios  $3^* + 3 = 6$  meses para conseguir inocular un cocultivo en reactor.

---

\* Paralelamente a los cultivos de *Nitrosomonas* (3 meses), se realizaron los de *Nitrobacter* (2 meses)



**Figura 4.1.-** Fotografía realizada mediante microscopio óptico de un cultivo mixto de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* (1000 aumentos, contraste de fases sobre célula de conteo).

#### 4.1.2.- Cocultivos en biorreactor

Como reactor de trabajo se utilizó el fermentador comercial Biostat B (B. Braun Biotech S.A., Melsungen, Alemania), de 2L de volumen útil.

A partir de unos 100 ml de inóculo (de los cocultivos en erlenmeyer) se arrancó un cultivo mixto de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* de 750 mL de volumen total, en medio autótrofo (la composición se detalla en el capítulo *Materiales y Métodos*). Las condiciones del cultivo se precisan en la **tabla 4.1.**, además, se mantuvo el reactor en oscuridad, para evitar fotoinhibición. Se realizó un seguimiento de las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ . Se realizaron adiciones de medio fresco hasta alcanzar los 2 L de volumen de cultivo.

**Tabla 4.1.-** Condiciones de cultivo mixto en el fermentador Biostat B.

Variable	Valor	Control
Temperatura	28 °C	automático
pH	7.80-8.20	automático ( $\text{CO}_2$ ) / manual ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
Oxígeno disuelto	60-100 %	sin control automático
Agitación	300 r.p.m.	automático

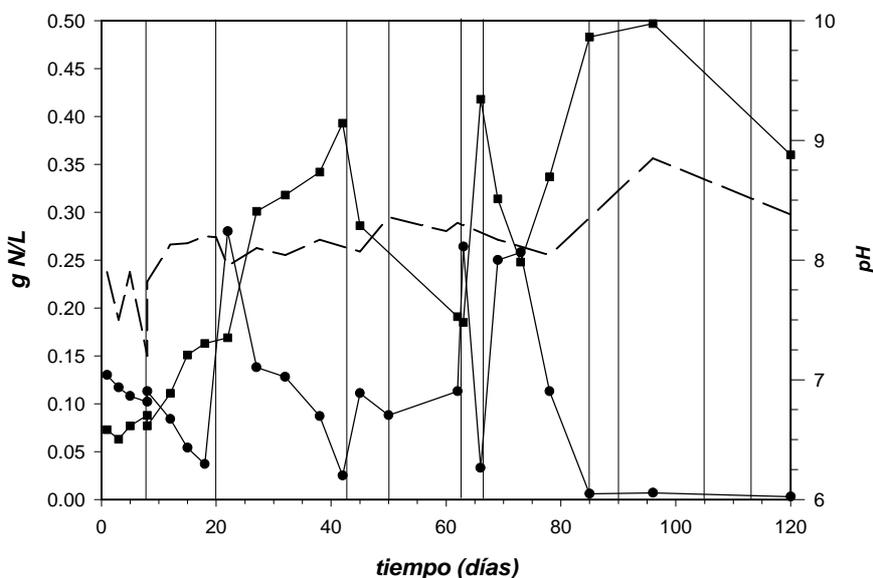
La adición automática de  $\text{CO}_2$  desde la estación de mezcla de gases de la cual dispone el fermentador es de importancia relevante debido al hecho que tanto en la fase de latencia como en un eventual agotamiento de substratos, el pH se basicifica rápidamente por acción del arrastre de  $\text{CO}_2$  que produce la aeración sobre la fase líquida.

Una vez se alcanzó la capacidad normal de trabajo del biorreactor se optó por extraer 500 mL de caldo de cultivo y añadir, seguidamente, 500 mL de medio fresco cuando se agotaba el amonio (operación en semi-continuo). De esta manera, se evitaba trabajar en continuo durante períodos prolongados, lo que hubiese provocado un riesgo de accidentes mucho mayor; además, dado los objetivos de este cocultivo, no era imprescindible trabajar siguiendo un modo de operación demasiado estricto. El oxígeno disuelto se mantenía estable (en torno a un 90 %). Por esta razón no se controlaba automáticamente. En algunas ocasiones (después de las adiciones de medio) el oxígeno disuelto descendió hasta el 60 % durante unas horas.

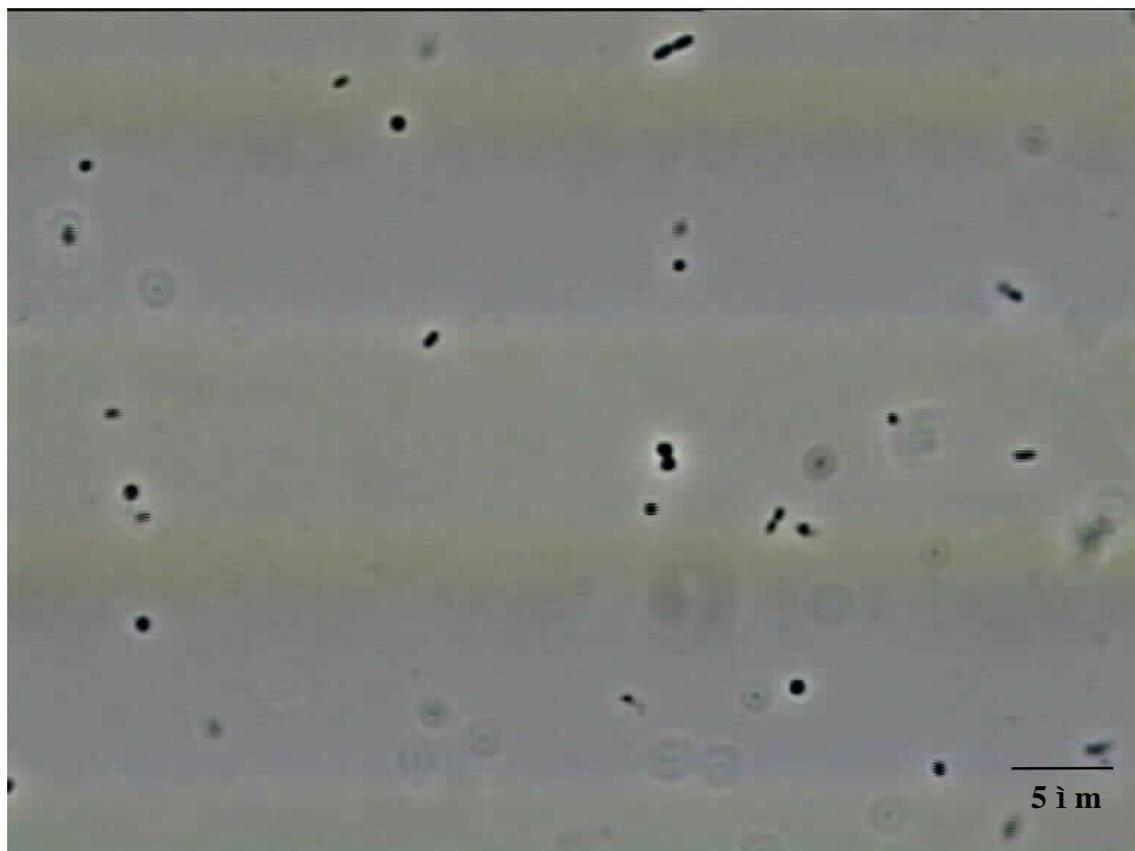
En la **figura 4.2.** se presenta el seguimiento del cocultivo, detallándose las concentraciones de amonio y nitrato, así como, el pH y las adiciones de amonio y medio fresco. Recopilando datos de tiempo, desde que se inició el cultivo de *Nitrosomonas europaea* hasta conseguir un cultivo mixto de 2 L en biorreactor, transcurrieron: 3 + 3 + 3 = 9 meses.

Se realizaron observaciones microscópicas del cultivo, como las que se presentan en la **figura 4.3.**

A partir de la suspensión obtenida (de salida del reactor) se inocularon algunos de los reactores de lecho fijo, como ya se detallará, más adelante, en este cuarto capítulo.



**Figura 4.2.- Evolución de las concentraciones de amonio y nitrato de un cocultivo de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* en el reactor Biostat B. — — pH, ● concentración de amonio, y ■ concentración de nitrato. Las líneas verticales representan las adiciones de medio fresco o de amonio.**



**Figura 4.3.- Fotografía realizada mediante microscopio electrónico de un cultivo mixto en biorreactor de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* (1000 aumentos, contraste de fases).**

#### *Análisis elemental de la biomasa*

Debido a los pocos datos existentes en la bibliografía respecto a la composición elemental de cultivos puros de estos microorganismos se consideró de interés utilizar una parte de la biomasa obtenida mediante los cultivos descritos para realizar análisis de composición elemental.

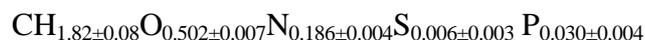
Para determinar la composición elemental de la biomasa obtenida, se recogieron parte de las células extraídas de este cultivo (aproximadamente 1 L). La muestra fue centrifugada y resuspendida varias veces en una solución tampón de fosfato (0.04 M NaCl, 50 mM de tampón fosfato al pH del medio de cultivo y 50 mM de  $MgSO_4$ ), para minimizar el contenido en sales. Después de este proceso, se procedió a la liofilización de la biomasa, y se enviaron dos alícuotas al laboratorio del CNRS en GIF/Yvette (Francia), donde fueron analizadas para determinar la composición elemental de C, H, O, N, S y P.

Los resultados obtenidos en porcentaje y la composición elemental en base molar respecto al carbono se presentan en la **tabla 4.2**.

**Tabla 4.2.- Resultados del análisis elemental de un cocultivo en suspensión de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi*.**

Elemento	Porcentaje en peso		Base molar (carbono)	
	alícuota 1	alícuota 2	alícuota 1	alícuota 2
	muestra 1/muestra 2	muestra 1/muestra 2	muestra 1/muestra 2	muestra 1/muestra 2
C	40.98/41.05	41.33/40.79	1.000/1.000	1.000/1.000
H	6.36/6.18	6.15/6.18	1.862/1.807	1.786/1.818
O	24.06/23.91	24.13/24.11	0.503/0.499	0.500/0.507
N	10.15/10.05	10.21/10.19	0.186/0.184	0.185/0.187
S	0.75/0.61	0.91/0.56	0.007/0.006	0.008/0.005
P	3.33/2.86	3.27/--	0.031/0.027	0.031/--

A partir de estos datos, la fórmula empírica por mol de carbono, queda:



Las condiciones de operación y la composición del medio utilizado afectan directamente al metabolismo de los microorganismos y por tanto, también a la composición elemental. Por esta razón y aunque la precisión de los análisis sea relativamente satisfactoria, el resultado tiene por tanto ciertas limitaciones. El estequiometría genérica de los microorganismos nitrificantes presentada por Roels (1983) es:  $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ , valores próximos a los determinados en los análisis presentados.

---

## **4.2.- Columnas a escala laboratorio**

---

Los reactores de lecho fijo a escala laboratorio se diseñaron con la intención de aumentar el número de experimentos posibles a realizar simultáneamente a los cultivos llevados a cabo con el reactor piloto. Como se ha descrito en el capítulo *Materiales y Métodos*, las columnas conservan la estructura del reactor piloto (tres secciones, con el lecho en la parte central, agitación magnética en la parte inferior y recirculación externa de la fase líquida), pero reducen considerablemente la instrumentación y el control de estos biorreactores. Esta reducción en las prestaciones se debe principalmente al reducido volumen de estos reactores, y por supuesto también al desmesurado incremento económico que supondría el dotar de toda la instrumentación a las secciones superior e inferior de los tres reactores que se construyeron. No obstante, esta instrumentación (ya descrita en el capítulo *Materiales y Métodos*) permite mantener perfectamente las principales variables de operación en estos reactores a escala laboratorio: aeración, temperatura y pH.

### **4.2.1.- Caracterización física**

La caracterización física de un reactor multifásico es de enorme utilidad tanto para conocer más profundamente el sistema y así poder comprender las respuestas de éste ante las perturbaciones, como para conseguir disponer de un buen punto de partida a la hora de modelizar el proceso.

Dentro de este término se agrupan varios aspectos: el estudio del tipo de flujo de la fase líquida (que se llevará a cabo mediante experimentos de distribución del tiempo de residencia), la determinación del volumen que ocupan las diferentes fases (líquida, gas, sólida -biopelícula y soporte-), y si éstas están afectadas por las condiciones de operación. Por último, al tratarse de biorreactores que llevarán a término un proceso aerobio en el que *a priori* se señala por diferentes autores que la transferencia de oxígeno entre fases es un parámetro clave de operación (Campos, 2000; Martins dos Santos *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 1998; Wijffels, 1994; Hendrikus *et al.*, 1993; Hanaki *et al.*, 1990b), es necesario estudiar el transporte de oxígeno entre la fase gas y la líquida en los reactores empleados. Para ello se realizan diferentes experimentos para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de materia para el oxígeno entre la fase gas y la líquida.

#### **4.2.1.1.- Determinación de volúmenes de sólido, líquido y gas**

Para determinar el volumen ocupado por las diferentes fases en un reactor multifásico, es necesario comenzar definiendo las condiciones de operación del reactor (véase la **tabla 4.201.**), ya que a menudo entre éstas se halla el caudal de gas, que influye en gran medida en los volúmenes relativos de la fase gas (retención de gas o *hold-up*) y de

la fase líquida. Por otra parte, la fase sólida está constituida por el soporte e inicialmente se podría considerar la biopelícula que se desarrollará sobre éste, también como parte de la fase sólida (al menos para determinar la influencia sobre el volumen de la fase líquida). No obstante, como ya se ha comentado en el capítulo introductorio, la biopelícula está integrada por los diferentes estratos de células y se considera como una fase diferenciada del soporte (que en el caso del presente trabajo es inerte).

**Tabla 4.201.- Condiciones que afectan el volumen relativo de las diferentes fases en los biorreactores.**

<b>Variables</b>	<b>Rango</b>	<b>Fases sobre las que tiene efecto</b>
Caudal de gas	0-500 mL/min	Gas + líquida
Temperatura	28-30 °C	Gas (principalmente)
Tiempo de cultivo	0-18 meses	Sólida (biopelícula + soporte)

Dos efectos muy importantes se derivan de la variación de los volúmenes relativos de cada una de las fases: en primer lugar una variación tanto del volumen de la fase gas como de la fase sólida produce variaciones del volumen de la fase líquida y esto implica alteraciones del tiempo de residencia hidráulico. En segundo lugar, una variación del caudal de aeración causa variaciones en la transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida (varía el valor del coeficiente de transferencia  $K_{La}$ ), ya que la retención de gas afecta al tiempo de residencia del gas y tiene influencia sobre el área interfacial (gas-líquido) disponible para la transferencia de materia (Schügerl, 1991).

El efecto de la temperatura no se ha juzgado importante en el rango de trabajo, y por esta razón no se ha determinado la influencia de esta variable en los volúmenes relativos de cada una de las fases.

El volumen teórico total a partir de las dimensiones del reactor se presenta en la **tabla 4.202.**, mientras que el volumen total medido experimentalmente es de 650 mL.

**Tabla 4.202.- Volumen teórico total de cada una de las partes de las columnas a escala laboratorio.**

	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Altura (mm)</b>	<b>Volumen total (mL)</b>
<b>Parte superior</b>	38	22	24.95
	38-78	20	52.84
	78	30	143.35
<b>Parte central</b>	38	267	302.81
<b>Parte inferior</b>	38	79	89.60
<b>Rejillas y juntas</b>	38	8	9.07
<b>TOTAL</b>			622.62

## Procedimiento experimental

El método experimental utilizado para determinar el volumen de cada una de las fases es el denominado técnica de expansión del volumen. Este método se ha seleccionado debido a su combinación de simplicidad y fiabilidad. En el método de expansión del volumen se utilizan las medidas del volumen de líquido sin aerar, estático (con las partículas de soporte en su interior) y el volumen una vez está circulando gas, para así determinar la retención de gas en el reactor. La determinación del volumen de sólido se realizó también, usando el mismo método, a partir de las medidas de volumen de líquido antes y después de la introducción de las partículas de soporte en el lecho.

### Volumen de sólido

La determinación del volumen de sólido se realizó a partir del volumen de soporte utilizado, antes de la operación del reactor, por tanto sin tener en cuenta el volumen de biopelícula (véase apartado 4.2.2.3. para conocer estimaciones del volumen de biopelícula). El volumen de soporte determinado experimentalmente es de 138 mL.

El volumen de soporte en principio se considera constante durante el tiempo de operación, excepto en el caso que el soporte sea susceptible de sufrir deformación. El poliestireno es un material que no tiene una gran resistencia mecánica, y además de no poder esterilizarse mediante calor, tiene otros inconvenientes: si las condiciones de presión en el reactor durante la operación superan ciertos límites, las partículas del soporte pueden deformarse, disminuyendo el volumen de sólido, y provocando además dificultades en la circulación de la fases líquida y gas a través del lecho.

### Volumen de gas

El volumen de gas se determinó para tres condiciones diferentes de caudal de aeración, y los resultados de esta determinación se muestran en la **tabla 4.203**. En esta tabla se incluyen también los resultados de las determinaciones de los volúmenes de la fase líquida.

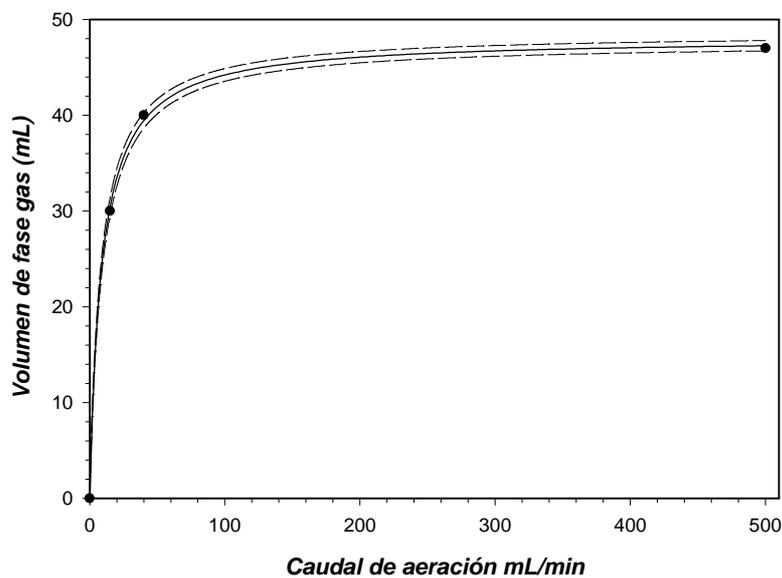
Se ajustó una ecuación para determinar la variación de la retención de gas en el reactor a cualquier valor de caudal de aeración utilizado, la ecuación ajustada se presenta en la **ecuación 4.201.**, la representación gráfica del ajuste se muestra en la **figura 4.201.**

$$\text{Volumen de gas} = \frac{(48.1 \pm 0.5) \cdot \text{Caudal de aeración}}{(8.8 \pm 0.5) + \text{Caudal de aeración}} \quad (4.201.)$$

Con un coeficiente de correlación de la ecuación linealizada de 0.9998. A pesar de que la bondad del ajuste realizado puede considerarse como satisfactoria, el número de puntos utilizado es bajo (4 incluyendo el cero), con lo que sólo permite definir como primera aproximación el comportamiento observado dentro del rango de estudio.

**Tabla 4.203.- Volumen experimental de la fase gas y de la fase líquida en las columnas a escala laboratorio para distintos valores del caudal de gas alimentado. La retención de gas se ha calculado como volumen de gas / (volumen de gas + volumen de líquido)**

Caudal de gas (mL/min)	v.v.m. (min <sup>-1</sup> )	Volumen de gas (mL)	Retención de gas (%)	Volumen de líquido (mL)
15	0.03	30	6	482
40	0.08	40	8	472
500	1.0	47	9	465



**Figura 4.201.- Variación del volumen ocupado por la fase gas respecto al caudal de aeración empleado. • puntos experimentales, — ajuste realizado mediante el método de mínimos cuadrados, - - - estimación de la bondad del ajuste, a partir de la precisión de los parámetros.**

### Estimación de la fracción de partículas del lecho

La fracción de lecho ocupada por las partículas se puede estimar a partir del volumen de sólido y de los volúmenes teóricos totales de cada una de las partes:

$$e_p = \frac{\text{Volumen de sólido}}{\text{Volumen total de lecho}} = \frac{138}{302.81 + \frac{9.07}{2}} = 0.45 \quad (4.202.)$$

### Estimación del área específica del lecho

A partir de la estimación realizada de la porosidad del lecho y teniendo en cuenta el diámetro medio de las partículas es posible realizar una estimación del área específica del lecho:

$$a = \frac{\text{Volumen de sólido}}{\text{Volumen total de lecho}} \cdot \frac{\text{Superficie de partícula}}{\text{Volumen de partícula}} = e_p \cdot \frac{p \cdot d_p^2}{\frac{p}{6} \cdot d_p^3} = e_p \cdot \frac{6}{d_p} = \quad (4.203)$$

$$= 0.45 \cdot \frac{6}{4.1 \cdot 10^{-3}} = 656 \text{ m}^2/\text{m}^3$$

Mientras que el área específica que habitualmente se encuentra en la bibliografía está referida al volumen total del reactor (y no únicamente respecto al volumen de lecho):

$$A = \frac{\text{Volumen de sólido}}{\text{Volumen total de reactor}} \cdot \frac{\text{Superficie de partícula}}{\text{Volumen de partícula}} = \frac{138}{650} \cdot \frac{6}{d_p} = 311 \text{ m}^2/\text{m}^3 \quad (4.204)$$

Esta estimación del área específica de reactor es, por tanto, la superficie inicial disponible, que irá aumentando a medida que se desarrolle la biopelícula, ya que el volumen y por tanto la superficie de la partícula irá aumentando con el incremento progresivo del grosor de la biopelícula.

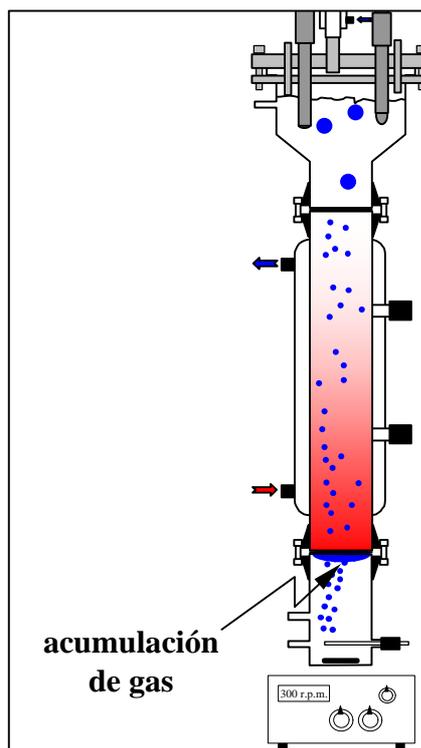
Por otra parte, este valor de superficie disponible no refleja la microrrugosidad del soporte. Las partículas de poliestireno están integradas por esferas microscópicas que aumentan la superficie y favorecen la adsorción de las primeras células al soporte (tal y como se ha descrito en el capítulo introductorio –apartado 1.4.6–, según Characklis y Marshall, 1990; véase también apartado 4.2.2.4., para observaciones microscópicas).

### Distribución de la retención de gas a lo largo del reactor

Cuando se examinó visualmente el flujo de gas en el reactor se observó una distribución no homogénea. El gas se acumula justo a la entrada del lecho, provocando una interrupción en el caudal de burbujas a lo largo de la columna de lecho fijo (ilustrado en la **figura 4.202.**). Este hecho pone de manifiesto la distribución heterogénea de la fase gas a lo largo del reactor. Experimentalmente se estimó (utilizando el mismo método de expansión de volumen) la retención de gas en las diferentes secciones del reactor.

Los resultados de estas determinaciones se presentan en la **tabla 4.204.**

Estas estimaciones de las diferentes retenciones de la fase gas permiten demostrar que la fase gas se distribuye de forma no homogénea a lo largo del biorreactor.



**Figura 4.202.-** Esquema de los reactores a escala laboratorio donde se ilustra la distribución de la fase gas a lo largo de la columna. El color azul representa la fase gas.

**Tabla 4.204.-** Resultados de la determinación experimental del volumen de la fase gas. Las determinaciones se realizaron a un caudal de aeración de 40 mL/min. La retención de gas se ha calculado como volumen de gas / (volumen de gas + volumen de líquido)

Sección del reactor	Volumen de gas en mL	Retención de gas en cada sección
Superior	3.75	2 %
Lecho	8.75	5 %
Inferior	27.5	29 %

#### 4.2.1.2.- Experimentos de distribución del tiempo de residencia

Para estudiar el tipo de flujo de la fase líquida en el reactor se realizaron experimentos de distribución del tiempo de residencia. Como se ha comentado en el capítulo *Materiales y Métodos*, se seleccionó azul de dextrano como trazador, y se llevó a cabo una inyección en pulso del trazador en la sección inferior del reactor. Las muestras se extraían de la sección superior del reactor. Se realizaron diferentes experimentos bajo diferentes condiciones de operación, las condiciones empleadas en cada de uno de los

experimentos se presentan en la **tabla 4.205.**, y fueron seleccionadas de forma que se cubría el rango de operación previsto de estos reactores.

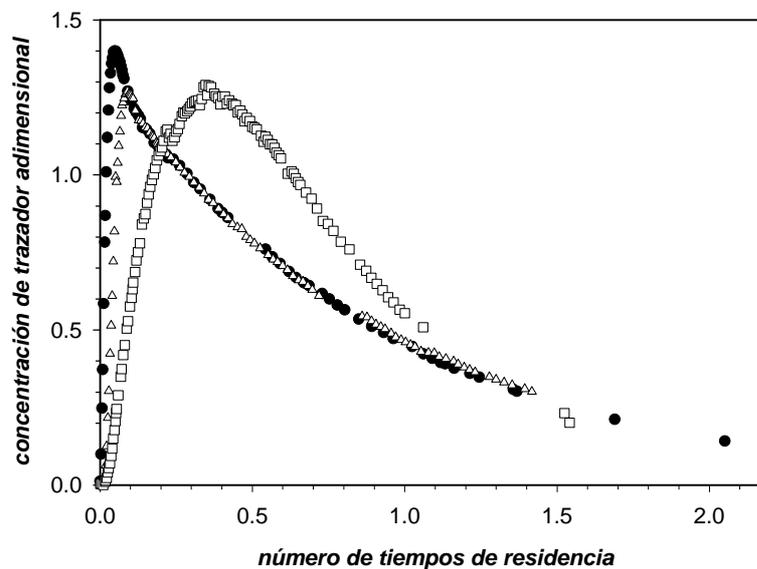
Los resultados de los experimentos de distribución del tiempo de residencia se representan en la **figura 4.203.**, de forma adimensional, lo que permite realizar fácilmente comparaciones entre experimentos. Para ello se han adimensionalizado tiempo y concentración de trazador de la forma siguiente (Levenspiel, 1979):

$$\text{Número de tiempos de residencia} = \frac{\text{tiempo}}{\text{tiempo de residencia}} = \frac{\text{tiempo}}{\frac{\text{caudal de líquido}}{\text{volumen de líquido}}} \quad (4.205)$$

$$\text{Concentración de trazador adimensional} = \frac{\text{concentración} \cdot \text{volumen de líquido}}{\text{masa de trazador}} \quad (4.206)$$

**Tabla 4.205.- Condiciones de operación del reactor durante los diferentes experimentos de distribución del tiempo de residencia.**

Nº de experimento	Caudal de gas (mL/min)	Caudal de líquido (mL/min)	Agitación (r.p.m.)	Caudal de recirculación (mL/min)	Relación de recirculación (entrada/rec.)
1	40	0.85	300	0	--
2	40	0.85	300	4.5	1/6
3	500	0.80	300	4.5	1/6



**Figura 4.203.- Experimentos de distribución del tiempo de residencia.** □ experimento 1 (40 mL/min de aeración y sin recirculación), ▲ experimento 2 (40 mL/min de aeración y relación de recirculación de 1/6), ● experimento 3 (500 mL/min de aeración y relación de recirculación de 1/6).

El modelo hidrodinámico asociado comúnmente a un lecho fijo es el de flujo en pistón, debido a la geometría del reactor (relación altura / diámetro elevada) y a que en general estos reactores no disponen de agitación. Existen al menos tres factores que favorecen la mezcla en los reactores a escala laboratorio: la agitación mecánica situada en la sección inferior, la recirculación externa del reactor y por último, el caudal de gas que se alimenta. Por tanto, estos factores provocan que el comportamiento esperado *a priori* del sistema no sea el de flujo en pistón puro. Tanto es así, que en los resultados obtenidos con los experimentos de distribución del tiempo de residencia, se aprecia como en general el comportamiento es cercano al de un tanque agitado (sobre todo en los casos en los que la relación de recirculación utilizada es elevada y el caudal de aeración también lo es).

A partir del análisis cualitativo de la representación gráfica de la concentración adimensional de trazador frente al número de tiempos de residencia, es posible afirmar que existe también una desviación del comportamiento de tanque perfectamente agitado, incluso en las condiciones que más favorecen la mezcla (experimento 3, con elevada aeración y elevada relación de recirculación). En los tres experimentos existe un máximo de concentración adimensional de trazador muy por encima de la unidad. Además, se observa, que la recirculación externa de la fase líquida favorece en gran medida el grado de mezcla en el reactor.

La presencia de un máximo de concentración adimensional de trazador por encima de la unidad sugiere un volumen muerto (Levenspiel, 1979). Si se examina la geometría del reactor, se observa que la diferencia de diámetros de la sección superior puede influir negativamente en el grado de mezcla del reactor, y que es posible que parte del volumen de líquido de esta sección no llegue a mezclarse completamente.

Estas consideraciones permiten definir un modelo compartimentado del reactor y ajustar sus parámetros, lo que se desarrolla en el siguiente apartado.

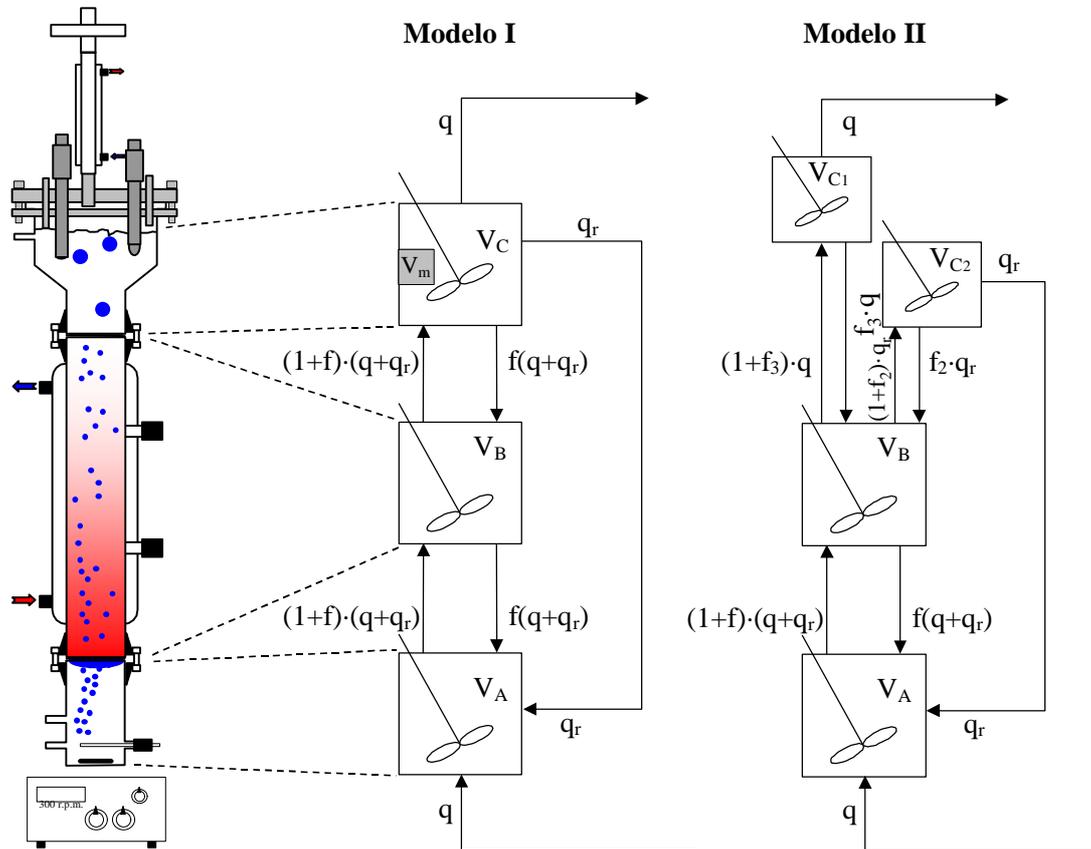
Se puede considerar que el grado de mezcla de la fase líquida en los reactores a escala laboratorio es cercano al de un tanque agitado, pero existe una desviación que está asociada a la presencia de un volumen muerto, probablemente relacionado con la geometría de la sección superior del reactor.

#### ***4.2.1.3.-Modelo de flujo***

##### **Consideraciones iniciales**

El primer paso para conseguir ajustar un modelo de flujo que consiga describir satisfactoriamente los resultados de los experimentos presentados de distribución del tiempo de residencia, es definir dicho modelo, de acuerdo con las observaciones previas efectuadas en el reactor. En el caso de los reactores a escala laboratorio se ha partido de dos posibles modelos, que se representan esquemáticamente en la **figura 4.204**. En el denominado modelo I, se divide el reactor en tres tanques agitados, cada uno de los cuales representa una de las secciones inferior, central (lecho), y superior del reactor. Además se introducen dos parámetros que serán estimados a partir de optimización numérica: el caudal

de retromezcla (coeficiente  $f$  de retromezcla), que está asociado al efecto de la aeración sobre la mezcla de la fase líquida, y el volumen muerto asociado a la sección superior ( $V_m$ ). En cambio, el denominado modelo II, se diferencia del descrito por separar el volumen de la sección superior en dos tanques independientes (véase figura 4.204.).



**Figura 4.204.- Esquema de los modelos de flujo propuestos. Donde:  $q$  es caudal de entrada al reactor,  $q_r$  el caudal de recirculación externa,  $V_i$  el volumen de cada una de las partes (siendo A: sección inferior, B: lecho y C: sección superior y  $V_m$  volumen muerto),  $f$ ,  $f_2$  y  $f_3$  coeficientes de retromezcla y  $f(q+q_r)$ ,  $f_2 \cdot q$  y  $f_3 \cdot q_r$  caudales de retromezcla entre tanques.**

Una vez se ha definido el tipo de modelo, es posible plantear los balances de materia para el trazador, en las condiciones de los experimentos, y definir las condiciones iniciales del sistema de ecuaciones diferenciales (**ecuaciones 4.207. - 4.209.** para el modelo I):

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{1}{V_A} [q_r \cdot C_C + f \cdot (q + q_r) \cdot C_B - (1 + f)(q + q_r) \cdot C_A] \quad (4.207.)$$

$$\frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{V_B} [(1 + f)(q + q_r) \cdot C_A + f \cdot (q + q_r) \cdot C_C - (1 + 2 \cdot f)(q + q_r) \cdot C_B] \quad (4.208.)$$

$$\frac{dC_C}{dt} = \frac{1}{V_C} [(1 + f)(q + q_r) \cdot C_B - (1 + f)(q + q_r) \cdot C_C] \quad (4.209.)$$

Donde  $C_A$ ,  $C_B$  y  $C_C$ , son las concentraciones de trazador en cada uno de los tanques A, B y C definidos en el modelo I,  $V_A$ ,  $V_B$  y  $V_C$  son los volúmenes de cada uno de estos tanques,  $q$  y  $q_r$  son los caudales de entrada y recirculación respectivamente,  $f$  es el coeficiente de retromezcla (uno de los parámetros ajustables del modelo).

Valores de las variables conocidas en el modelo I:

$$V_A = 0.0683 \text{ L}$$

$$V_B = 0.1705 \text{ L}$$

$$V_C = (0.2332 - V_{muerto}) \text{ L}$$

$$q = [0.80-0.85] \cdot 10^{-3} \text{ L/min (dependiendo del experimento)}$$

$$q_r = [0, 4.5] \cdot 10^{-3} \text{ L/min (dependiendo del experimento)}$$

Donde  $V_{muerto}$ , es el segundo de los parámetros ajustables del modelo I. Condiciones iniciales de las ecuaciones 4.207., 4.208, 4.209.:  $C_A = M/V_A$ ;  $C_B = C_C = 0$ , a tiempo  $t = 0$ . Donde  $M$  es la masa de trazador introducida en el pulso.

Para el caso del modelo II, el sistema de ecuaciones diferenciales es (4.210. - 4.213.):

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{1}{V_A} [q_r \cdot C_{C2} + f \cdot (q + q_r) \cdot C_B - (1 + f)(q + q_r) \cdot C_A] \quad (4.210.)$$

$$\frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{V_B} [(1 + f)(q + q_r) \cdot C_A + f_3 \cdot q \cdot C_{C1} + f_2 \cdot q_r \cdot C_{C2} - (f \cdot (q + q_r) + (1 + f_3) \cdot q + (1 + f_2) \cdot q_r) \cdot C_B] \quad (4.211.)$$

$$\frac{dC_{C1}}{dt} = \frac{1}{V_{C1}} [(1 + f_3) \cdot q \cdot C_B - (1 + f_3) \cdot q \cdot C_{C1}] \quad (4.212.)$$

$$\frac{dC_{C2}}{dt} = \frac{1}{V_{C2}} [(1 + f_2) \cdot q_r \cdot C_B - (1 + f_2) \cdot q_r \cdot C_{C2}] \quad (4.213.)$$

Donde  $f_2$  y  $f_3$  son coeficientes de retromezcla, pero sólo uno es parámetro ajustable, ya que al fijar  $f_2$ , el coeficiente  $f_3$  queda fijado mediante la expresión:

$$f_3 = \frac{f \cdot (q + q_r) - f_2 \cdot q_r}{q} \quad (4.214.)$$

Valores de las variables conocidas en el modelo II:

$$V_A = 0.0683 \text{ L}$$

$$V_B = 0.1705 \text{ L}$$

$$V_{C2} = (0.2332 - V_{C1}) \text{ L}$$

$$q = [0.80-0.85] \cdot 10^{-3} \text{ L/min (dependiendo del experimento)}$$

$$q_r = [0, 4.5] \cdot 10^{-3} \text{ L/min (dependiendo del experimento)}$$

Condiciones iniciales de las ecuaciones 4.210., 4.211., 4.212., 4.213.:  $C_A = M/V_A$ ;  $C_B = C_{C1} = C_{C2} = 0$ , a tiempo  $t = 0$ . Donde  $M$  es la masa de trazador introducida en el pulso. Por tanto, el modelo II poseerá tres parámetros ajustables:  $f$ ,  $f_2$  y  $V_{C1}$ , el parámetro  $f$  seguirá asociado a la aeración.

A partir de este modelo planteado a través de ecuaciones diferenciales ordinarias de valor inicial (balances de materia), es posible determinar el valor de los parámetros que minimice la suma del cuadrado de los errores entre la evolución teórica de la concentración de trazador (en el tanque C) y los puntos experimentales obtenidos en los experimentos de distribución del tiempo de residencia. La expresión general de esta función objetivo es la que se presenta en la **ecuación 4.215**.

$$f_{\text{objetivo}} = \sum_{i=1}^n (y_i^{\text{teórica}} - y_i^{\text{experimental}})^2 \quad (4.215.)$$

Siendo  $n$  el número de puntos del experimento;  $y_i^{\text{teórica}}$  la concentración teórica del tanque C en el instante  $t$  hallada al resolver el anterior sistema de ecuaciones diferenciales, e  $y_i^{\text{experimental}}$  la concentración de trazador real a la salida del reactor (sección superior) en el mismo instante  $t$ , determinada experimentalmente mediante absorbancia, en los experimentos de distribución del tiempo de residencia.

La resolución del sistema de ecuaciones diferenciales se realiza mediante métodos numéricos, se han utilizado dos métodos: método de Runge-Kutta-Fehlberg (4°-5° orden) de paso variable, y método modificado de Rosenbrock de segundo orden para funciones de difícil integración (denominados problemas *stiff*, *ode23s*, de la versión v. 5.1, The MathWorks, Inc. 1997). Con ambos se obtenían resultados muy similares en la integración. Una vez resuelto el sistema de ecuaciones, es necesario interpolar para conseguir el valor de concentración de trazador en el tanque C ( $y_i^{\text{teórica}}$ ) en el mismo instante en el que se dispone del valor experimental ( $y_i^{\text{experimental}}$ ); esta interpolación se realiza mediante el método de *splines* (polinomio de segundo grado, tres puntos, función de MATLAB, *interp1*).

Por otra parte, la optimización es multivariable (parámetros  $f$  y  $V_{\text{muerto}}$ , en el modelo I y  $f$ ,  $f_2$  y  $V_{C1}$  en el modelo II) con restricciones, ya que se impondrá que los parámetros sean positivos y además, que en el caso de los volúmenes, no provoquen que los volúmenes  $V_C$  y  $V_{C2}$  sean negativos, es decir:

$$f \geq 0, f_2 \geq 0 \quad (4.216.)$$

$$0 \leq V_{\text{muerto}} \leq 0.233 \quad (4.217.)$$

$$0 \leq V_{C1} \leq 0.233 \quad (4.218.)$$

Todos los cálculos se realizaron mediante MATLAB (v. 4.2b, The MathWorks, Inc. 1994). Se utilizaron como funciones de optimización: *constr*, *fmins*, *fmin*, y como funciones de resolución de ecuaciones diferenciales: *ode45* (modificada con el fin de que permita trabajar con los valores de los parámetros de optimización).

La bondad del ajuste se estima a partir de la norma:

$$\text{norma} = \sqrt{f_{\text{objetivo}}(ff_{\text{opt}})} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{teórica}} - y_i^{\text{experimental}})^2 (ff_{\text{opt}})} \quad (4.219.)$$

Donde  $f_{\text{objetivo}}(ff_{\text{opt}})$  es el valor de la función objetivo evaluada utilizando el vector de parámetros ( $ff$ ) que contiene los parámetros resultantes de la optimización numérica.

Después de haber definido cuál es el modelo a ajustar y cuál es el tipo de optimización que se utiliza, se procede a un análisis por separado de cada uno de los experimentos de distribución del tiempo de residencia.

### Experimento 1

(Sin recirculación,  $q_r$ : 0.0 mL/min; aeración: 40 mL/min;  $q$  = 0.8547 mL/min)

Prueba de consistencia (balance de trazador):

- masa medida de trazador inyectado: 0.1839 g;
- masa calculada (a partir de la integración de la curva del experimento de distribución del tiempo de residencia): 0.1825 g, porcentaje de desviación: 1 %.

El modelo II aplicado al caso en el que el caudal de recirculación de líquido es cero (experimento 1), es completamente equivalente al modelo I, ya que el volumen del cuarto tanque ( $V_{C2}$ ) sería un volumen muerto.

Como resultado de la optimización numérica se obtuvieron los siguientes valores de los parámetros:

Coefficiente de retromezcla: 0.7515 (caudal de retromezcla = 0.6 mL/min)

Volumen muerto: 93.1 mL.

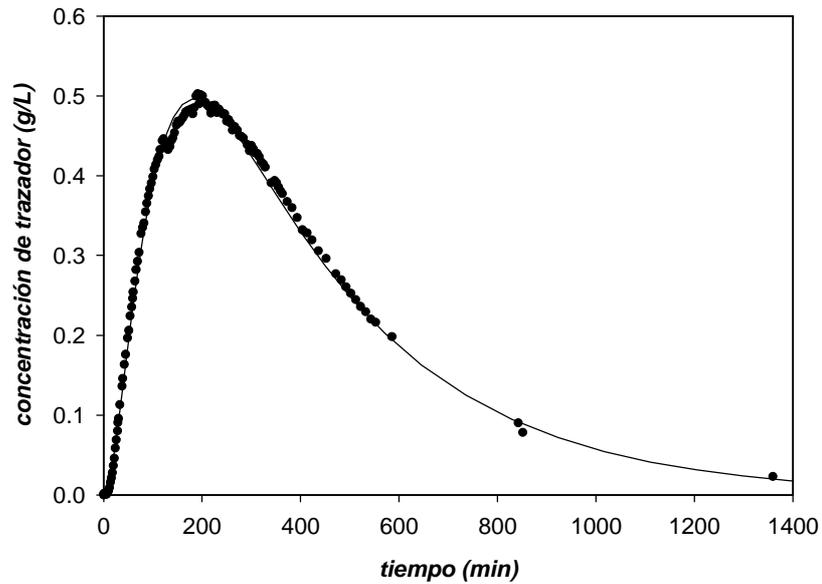
Bondad del ajuste (norma): 0.10

En la **figura 4.205**, se muestra la representación gráfica del ajuste realizado. Se ha realizado un análisis de sensibilidad de los parámetros obtenidos en la optimización (**figura 4.206**.) mediante el método propuesto por Draper *et al.* (1998) para estimar la precisión de los parámetros en un ajuste por mínimos cuadrados no lineal. El método de cálculo de las regiones de confianza se basa en la distribución  $F$ , que depende del número de parámetros ajustados ( $p$ ), del número de puntos experimentales ( $n$ ) y del nivel de confianza requerido ( $\mathbf{n}$ ):

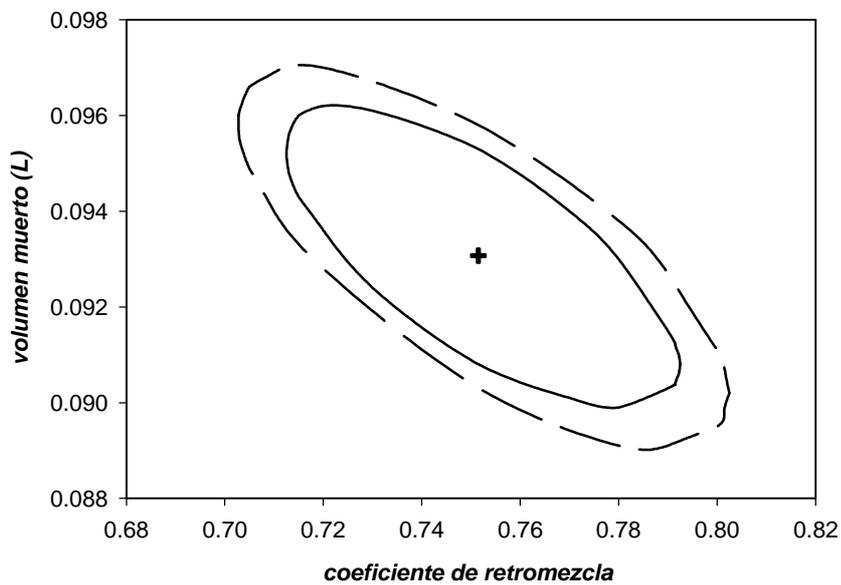
$$f_{\text{objetivo}}(ff) = f_{\text{objetivo}}(ff_{\text{opt}}) \left\{ 1 + \frac{p}{n-p} F(p, n-p, 1-\mathbf{n}) \right\} \quad (4.220.)$$

Donde  $f_{\text{objetivo}}(ff)$  es la función objetivo, y  $f_{\text{objetivo}}(ff_{\text{opt}})$  el valor óptimo de la función objetivo.  $ff$  es el vector de parámetros ajustables y  $ff_{\text{opt}}$  es el vector de parámetros que optimizan la función objetivo. De esta forma, para hallar la región de confianza de uno de los parámetros es necesario fijar el resto, y así obtener una función con una única variable y dos soluciones: los extremos del intervalo de confianza a un determinado nivel de confianza. Por ejemplo, para el caso de dos parámetros:

$$f_{\text{objetivo}}(\alpha, \beta) = f_{\text{objetivo}}(\alpha_{\text{opt}}, \beta_{\text{opt}}) \left\{ 1 + \frac{p}{n-p} F(p, n-p, 1-\mathbf{n}) \right\} \quad (4.221.)$$



**Figura 4.205.- Experimento 1 de distribución del tiempo de residencia. Sin recirculación y con un caudal de aeración de 40 mL/min. La línea continua es el resultado del modelo después de la optimización multiparamétrica.**



**Figura 4.206. Regiones de confianza de los parámetros hallados en la optimización del modelo de flujo en el experimento 1 de distribución del tiempo de residencia. Estas regiones se han determinado a dos niveles de confianza: 95% (—) y 99% (---). + parámetros que optimizan la función objetivo.**

Para calcular un intervalo de confianza de  $\hat{\alpha}$  se fijaría el valor de  $\hat{\mathbf{a}}$  y se soluciona la ecuación:

$$f_{\text{objetivo}}(\alpha) = f_{\text{objetivo}}(\alpha_{\text{opt}}, \beta_{\text{opt}}) \left\{ 1 + \frac{P}{n-p} F(p, n-p, 1-\mathbf{n}) \right\} \quad (4.222.)$$

Donde el miembro de la derecha es un escalar y  $f_{\text{objetivo}}(\mathbf{a})$  una ecuación de segundo grado, por tanto con dos soluciones: los extremos del intervalo de confianza de  $\mathbf{a}$  para un valor de  $\beta$  determinado. El método también es aplicable para optimización univariable (la región se convierte en un intervalo unidimensional).

Este análisis de sensibilidad permite determinar la influencia del valor cada uno de los parámetros en la respuesta del modelo a la vez que se estima la bondad de los parámetros hallados mediante la optimización. Como se puede observar en la figura 4.206., en una optimización multiparamétrica la bondad de uno de los parámetros depende del valor del resto de parámetros.

A partir de los resultados presentados en la figura 4.206. se puede observar como la respuesta del modelo es más sensible respecto a cambios en el parámetro volumen muerto que respecto a cambios en el coeficiente de retromezcla. Por otra parte, las variaciones máximas obtenidas en la estimación de la bondad de los parámetros son de un 11 % para el coeficiente de retromezcla y un 6 % para el volumen muerto, mientras que en torno al valor óptimo son un 8 % y un 4 % respectivamente (en todos los casos para un nivel de confianza del 95 %).

## Experimento 2

(Caudal de recirculación,  $q_r$ : 4.5 mL/min; aeración : 40 mL/min;  $q = 0.8544$  mL/min)

Prueba de consistencia (balance de trazador):

- masa medida de trazador: 0.1825 g;
- masa calculada (a partir de la integración de la curva del experimento de distribución del tiempo de residencia): 0.1726 g, porcentaje de desviación: 6 %.

1ª Optimización (modelo I, multivariable con restricciones):

Parámetros obtenidos:

Coefficiente de retromezcla: 0.027 (caudal de retromezcla = 0.14 mL/min)

Volumen muerto: 52.4 mL.

Bondad del ajuste (norma): 0.21

2ª Optimización (modelo II, multivariable con restricciones):

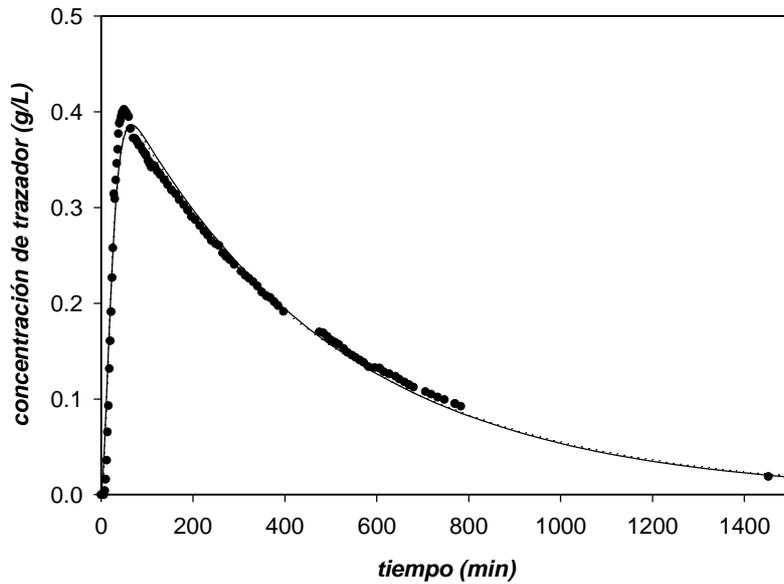
Parámetros obtenidos:

Coefficientes de retromezcla:  $f = 0.038$  (0.2 mL/min),  $f_2 = 0$

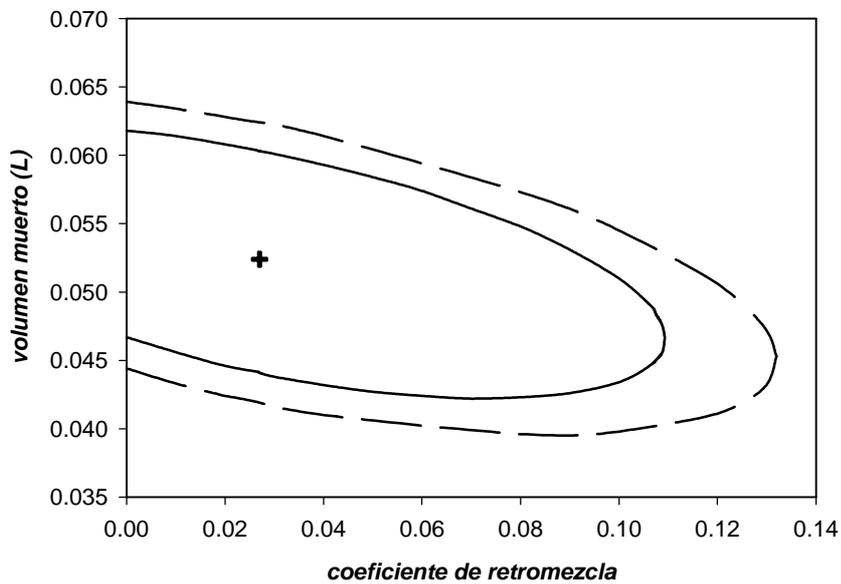
Volumen del cuarto tanque  $V_{C2} = 89.3$  mL

Bondad del ajuste (norma): 0.21

En la **figura 4.207.** se muestra la representación gráfica de los ajustes realizados y en la **figura 4.208.** el análisis de sensibilidad realizado.



**Figura 4.207.- Experimento 2 de distribución del tiempo de residencia. Caudal de recirculación de 4.5 mL/min y caudal de aeración de 40 mL/min. — modelo I, ..... modelo II (prácticamente solapadas).**



**Figura 4.208. Regiones de confianza de los parámetros hallados en la optimización del modelo de flujo en el experimento 2 de distribución del tiempo de residencia. Estas regiones se han determinado a dos niveles de confianza: 95% (—) y 99% (---); + parámetros que optimizan la función objetivo.**

En la figura 4.208. correspondiente al análisis de sensibilidad, se observa como la respuesta del modelo es muy poco sensible respecto a la variación del parámetro coeficiente de retromezcla, alcanzando incluso valores negativos (no representados). Además la precisión de ambos parámetros es mucho menor que en el caso del experimento anterior.

### Experimento 3

(caudal de recirculación: 4.5 mL/min, aeración 500 mL/min;  $q = 0.7993$  mL/min)

Prueba de consistencia:

- masa medida de trazador: 0.1869 g;
- masa calculada (a partir de la integración de la curva del experimento de distribución del tiempo de residencia): 0.1763 g, porcentaje de desviación: 6 %.

*1ª Optimización (modelo I, multivariable con restricciones):*

Parámetros obtenidos:

Coefficiente de retromezcla:  $f = 1.771$  (caudal de retromezcla = 10.1 mL/min)

Estimación de la precisión del parámetro (mediante el método ya descrito, propuesto por Draper *et al.*, 1998):

Nivel de confianza 95 %      1.9     $f$     2.9

Nivel de confianza 99 %    1.9     $f$     3.0

Volumen muerto:  $V_m = 87.5$  mL.

Bondad del ajuste (norma): 0.10

*2ª Optimización (modelo I, univariable con restricciones):*

Parámetro obtenido:

Coefficiente de retromezcla:  $f = 2.000$  (caudal de retromezcla = 10.6 mL/min)

Volumen muerto (fijado):  $V_m = 52.4$  mL.

Bondad del ajuste (norma): 0.22

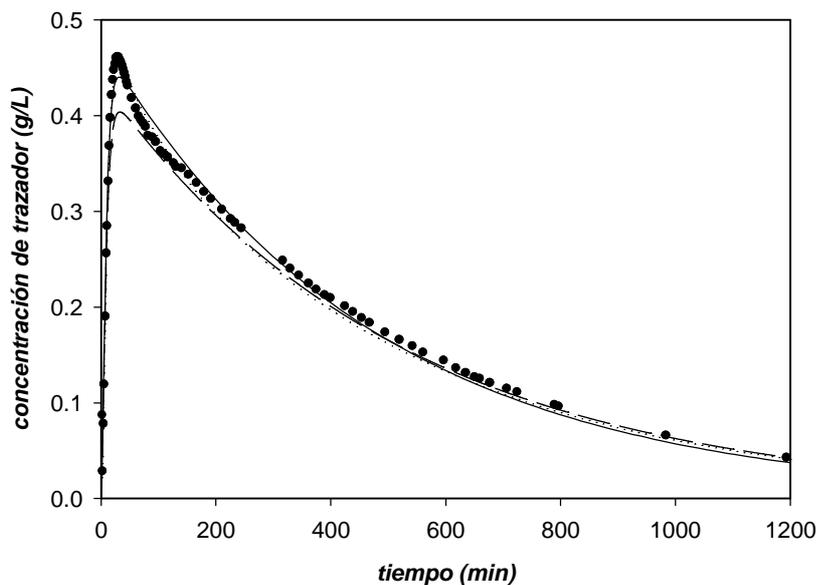
*3ª Optimización (modelo II, multivariable con restricciones):*

3 parámetros: dos caudales de retromezcla:  $f = 1.468$  (7.8 mL/min),  $f_2 = 1.621$  (7.3 mL/min), y volumen del cuarto tanque  $V_{C2} = 116.6$  mL.

Bondad del ajuste (norma): 0.08

En la **figura 4.209**. se muestra la representación gráfica de los ajustes realizados.

Examinando estos resultados, se observa que el modelo I es menos complejo que el modelo II (una ecuación diferencial menos y un parámetro ajustable menos), y aunque no obstante, los resultados obtenidos poseen una bondad en el ajuste ligeramente mayor, en ningún caso justifican el esfuerzo adicional de cálculo.



**Figura 4.209.- Experimento 3 de distribución del tiempo de residencia. Caudal de recirculación de 4.5 mL/min y caudal de aeración de 500 mL/min. — resultado del modelo I en la primera optimización, — — — resultado del modelo I en la segunda optimización, ..... resultado del modelo II en la tercera optimización.**

Por otra parte, entre las consideraciones iniciales, dos hipótesis de partida han servido para definir los diferentes tipos de optimizaciones realizadas: la primera es considerar que la aeración está asociada al parámetro coeficiente de retromezcla mientras que la segunda es considerar que la variación del parámetro volumen muerto está relacionada con la relación de recirculación. Una posibilidad simple sería identificar estos dos parámetros únicamente con una variable real de operación (caudal de aeración o caudal de recirculación), aunque en realidad tanto el caudal de aeración como el de recirculación influyan al mismo tiempo en ambos parámetros (coeficiente de retromezcla y volumen muerto).

En el caso del caudal de retromezcla, éste se ha correlacionado con la relación caudal de gas / caudal de líquido (proporcional a la relación velocidad superficial de gas / velocidad superficial de líquido). Mientras que en el caso del volumen muerto, la variación de este parámetro se ha asociado principalmente al caudal de recirculación, por esta razón se ha utilizado en el experimento 3 la optimización univariable, en la cual se toma como una constante el valor del volumen muerto, puesto que el experimento se realiza con la misma velocidad de recirculación que el experimento 2.

El modelo de flujo denominado modelo I permite describir el flujo de la fase líquida mediante dos parámetros ajustables: el coeficiente de retromezcla, principalmente asociado al caudal de aeración y el volumen muerto de la sección superior, principalmente asociado al caudal de recirculación.