

4.2.1.4.-Correlaciones entre parámetros y variables

De lo dicho anteriormente se pueden establecer relaciones numéricas para la región de trabajo estudiada que permiten correlacionar los parámetros anteriormente mencionados con las correspondientes variables de operación.

El caudal de retromezcla se puede relacionar con la relación de velocidades superficiales entre fases mediante la siguiente expresión:

$$\text{Caudal de retromezcla} = f \cdot (q + q_r) = a \cdot 10^{\frac{b \cdot u_G}{u_L}} \quad (4.223.)$$

Donde el caudal de retromezcla tiene unidades de mL/min, u_G es la velocidad superficial de la fase gas y u_L la de la fase líquida. Los parámetros a y b se han ajustado por el método de mínimos cuadrados (coeficiente de correlación 0.986):

$$a = 8.455 \cdot 10^{-2} \text{ mL/min}$$

$$b = 2.161 \cdot 10^{-2}$$

En la **figura 4.210.** se representa la correlación entre estas variables.

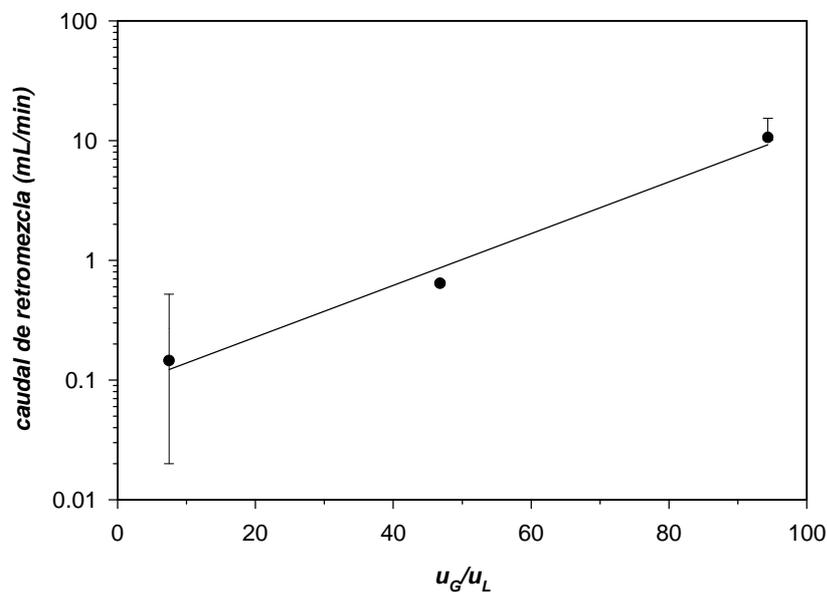


Figura 4.210.- Relación entre el caudal de retromezcla y la relación de velocidades superficiales entre las dos fases fluidas. Cuando aumenta el caudal de gas el caudal de retromezcla aumenta, mientras que si aumenta el caudal de líquido el caudal de retromezcla disminuye. Las barras de error representan la bondad del parámetro con un 95 % de confianza.

Por su parte el volumen muerto se correlaciona con el caudal de recirculación mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen muerto} = V_{\text{muerto}} \text{ (mL)} = 93.07 - 9.04 \cdot q_r \text{ (mL/min)} \quad (4.224.)$$

Estas relaciones permiten obtener una aproximación del flujo de la fase líquida en el reactor para unas determinadas condiciones dentro del rango estudiado de operación.

4.2.1.5.-Estudio del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida

El coeficiente de transferencia de oxígeno entre la fase gas y la líquida es un parámetro estudiado de forma habitual en procesos aerobios. En la bibliografía se hallan diferentes tipos de métodos experimentales (como ya se ha comentado en el capítulo *Materiales y Métodos*) y de correlaciones, sin embargo, tanto los métodos experimentales como las correlaciones teóricas o empíricas para sistemas biológicos, acostumbran a estudiar este coeficiente en reactores de tanque agitado y en columnas de burbujeo (Blanch y Clark, 1996). Aplicar estos métodos a un reactor de lecho empacado como el descrito requiere reconsiderar algunas de las hipótesis empleadas y adaptarlas a este caso menos estudiado.

El método “gas in-gas out” mediante sonda de oxígeno

Este método dinámico se ha aplicado al caso en el que la columna no está en operación, es decir, sin células. Para ello, el oxígeno se purga de la fase líquida con ayuda de una corriente de nitrógeno, hasta conseguir un valor de oxígeno disuelto aproximadamente de cero. Entonces se introduce un caudal determinado de aeración y se realiza un seguimiento de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto con ayuda de un electrodo (InPro 3000/120 / Mettler Toledo / Urdorf, Suiza) situado en la parte superior del reactor (véase figura 3.15, en el capítulo *Materiales y Métodos*). Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 30 ± 1 °C.

Tal y como se ha descrito en el capítulo *Materiales y Métodos*, es necesario determinar el tiempo de respuesta de la sonda de oxígeno utilizada en el experimento para conseguir determinar de forma precisa el coeficiente de transferencia. La dinámica de la sonda de oxígeno disuelto se debe tener en cuenta en la expresión que describe la evolución de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo (Chisti, M.Y., 1989):

$$C_{\text{med}} = C^* + \frac{C^* - C_0}{1 - \tau \cdot K_L a} \left[\tau \cdot K_L a \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) - \exp(-K_L a \cdot t) \right] \quad (4.225)$$

Donde C_{med} es la concentración de oxígeno disuelto medida (no real) a un tiempo t , C^* la concentración de saturación de oxígeno de la fase líquida, C_0 la concentración de oxígeno disuelto a la cual se inicia el experimento, y τ el tiempo de respuesta de la sonda.

El experimento de determinación de la constante de tiempo de respuesta de la sonda de oxígeno disuelto se presenta en la **figura 4.211**. Para realizar este experimento se hace llegar a la sonda a un valor de oxígeno disuelto cercano a cero, con ayuda de nitrógeno. En el instante cero del experimento el electrodo se sumerge en otra disolución que se encuentra saturada de oxígeno disuelto, y se sigue la evolución de la señal del electrodo. El tiempo que transcurra hasta alcanzar el 63.2 % de la saturación se considera el tiempo de respuesta de la sonda (suponiendo una respuesta de primer orden). Realizando este ajuste se estimó que la constante de tiempo de la sonda es de 27.5 ± 0.4 s, siendo el coeficiente de correlación de 0.998.

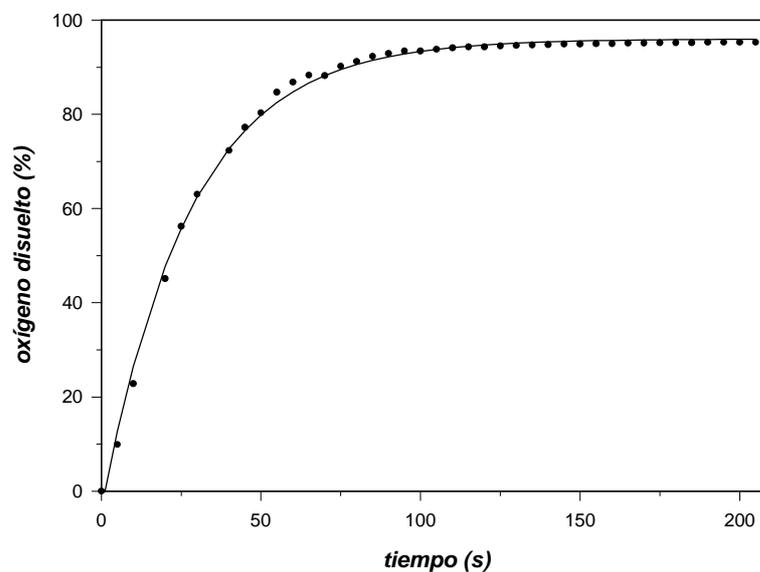


Figura 4.211.- Determinación de la constante de tiempo de respuesta de la sonda de oxígeno disuelto. ● puntos experimentales, — optimización numérica realizada (método de mínimos cuadrados). La bondad del ajuste no se representa gráficamente, ya que el error es inferior al 2 %.

Las condiciones de operación del reactor durante los diferentes experimentos junto con los resultados de la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia mediante este método se especifican en la **tabla 4.206**. Un ejemplo del ajuste realizado mediante el método de mínimos cuadrados (no lineal), se presenta en la **figura 4.212**. La precisión del ajuste es satisfactoria, puesto que el error relativo asociado al coeficiente es de menos de un 2 %, sin embargo los valores determinados no se pueden considerar como válidos, como se discute a continuación.

Tabla 4.206.- Condiciones de operación y resultados de los experimentos de determinación del coeficiente de transferencia de materia de la fase gas a la líquida para el oxígeno, método "gas in-gas out" mediante electrodo de oxígeno.

Caudal de gas (mL/min)	Agitación (r.p.m.)	Caudal de recirculación (mL/min)	v.v.m. (min^{-1})	K_{La} (s^{-1}) (sección superior)
40	300	4.5	0.08	0.0013
40	300	9	0.08	0.0016
40	500	4.5	0.08	0.0014
100	300	4.5	0.2	0.0032
250	300	4.5	0.5	0.0072
500	300	4.5	1.0	0.012

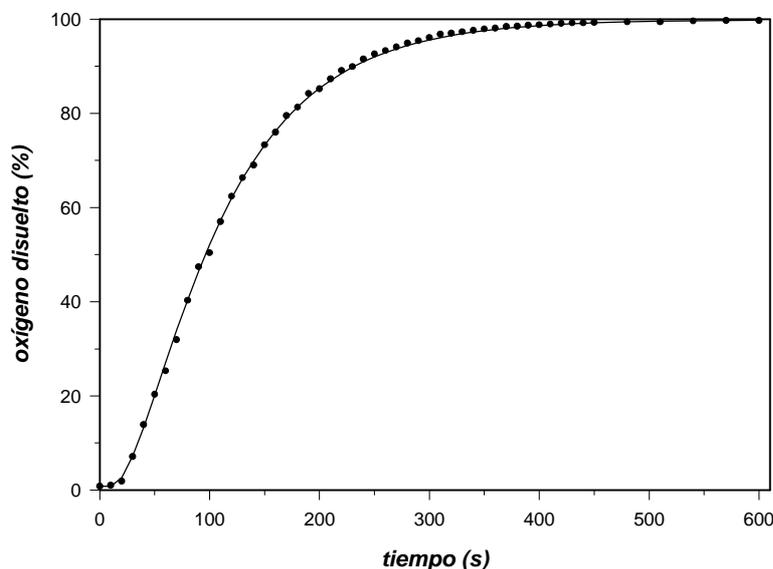


Figura 4.212.- Representación gráfica de la evolución del oxígeno disuelto durante uno de los experimentos de determinación del coeficiente de transferencia de materia de la fase gas a la líquida. ● puntos experimentales, — ajuste numérico realizado (método de mínimos cuadrados no lineal).

Del análisis de los valores obtenidos en la determinación del coeficiente K_{La} , y teniendo en cuenta los datos obtenidos en cuanto a degradación de amonio en las columnas operando en las mismas condiciones, como se puede consultar en el apartado 4.2.2.3., se puede deducir que los valores que se recogen en la tabla 4.206. no reflejan correctamente la transferencia de oxígeno en el lecho empacado, dado que deberían ser claramente más altos para que se cumpliera la estequiometría de la reacción efectuada en este reactor. Es decir, si se tienen en cuenta las conversiones de nitrificación obtenidas en los reactores operando en las mismas condiciones en que se ha determinado el valor del K_{La} , el oxígeno transferido desde la fase gas no cumple el balance de materia con respecto al necesario para la conversión que tiene lugar, de acuerdo con la estequiometría de la reacción.

Como punto de partida se analizaron los principales factores que afectan al valor del coeficiente K_{La} : en primer lugar la velocidad superficial del gas, y en segundo lugar el diámetro de las burbujas. La velocidad superficial del gas varía de forma importante a lo largo del reactor, ya que en cada una de las secciones (inferior, lecho y superior), la superficie efectiva transversal al flujo de gas es diferente. Además, de forma evidente, se observan diferencias entre los diámetros de burbuja de la parte inferior y la superior (véase figura 4.202.). Esto sugiere un valor de K_{La} heterogéneo a lo largo de la columna. Es decir, el valor del coeficiente K_{La} debe ser diferente en cada una de las secciones del reactor.

Teniendo en cuenta que la velocidad superficial del gas aumenta aproximadamente en un orden de magnitud entre el valor en el punto en que está situada la sonda y cualquier punto del lecho, se espera que las diferencias entre el valor del coeficiente en las distintas partes del reactor sean importantes.

Por otra parte, si la transferencia de oxígeno es diferente en las secciones del reactor, no es posible asociar el valor de coeficiente K_{La} de la tabla 4.206. a la sección superior (en la cual está ubicada la sonda de oxígeno). Esto es debido a que la mezcla de la fase líquida provoca que la variación del oxígeno disuelto en cada una de las secciones tenga dos contribuciones: la transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida en esa sección y la influencia de la mezcla de la fase líquida (procedente de las secciones contiguas).

Para poner de manifiesto la influencia de la mezcla de la fase líquida durante los experimentos realizados de determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, se ha realizado una simulación a partir del modelo de flujo propuesto y en las condiciones en las que se realizaron los experimentos. Los resultados obtenidos de evolución del oxígeno disuelto con el tiempo se presentan en la **figura 4.213**. Además se ha incluido en la misma figura la evolución de la concentración de oxígeno disuelto si cada una de las secciones fuesen independientes, y por tanto no estuviesen influenciadas por la mezcla de la fase líquida. Examinando la figura 4.213. se observa como la evolución del oxígeno disuelto en cada una de las fases está influenciada por la mezcla de la fase líquida, especialmente la sección superior.

Por tanto, los valores presentados en la tabla 4.206. como estimaciones del coeficiente K_{La} del reactor, no son representativos y para tratar de determinar experimentalmente el valor del coeficiente K_{La} es necesario utilizar otra metodología experimental, que permita obtener más información del sistema, como se describe en el siguiente apartado.

El coeficiente que tiene mayor influencia en la transferencia de oxígeno en el reactor es el que corresponde a la sección central (lecho, zona B), puesto que debido a la geometría del reactor es el que posee una mayor velocidad superficial del gas.

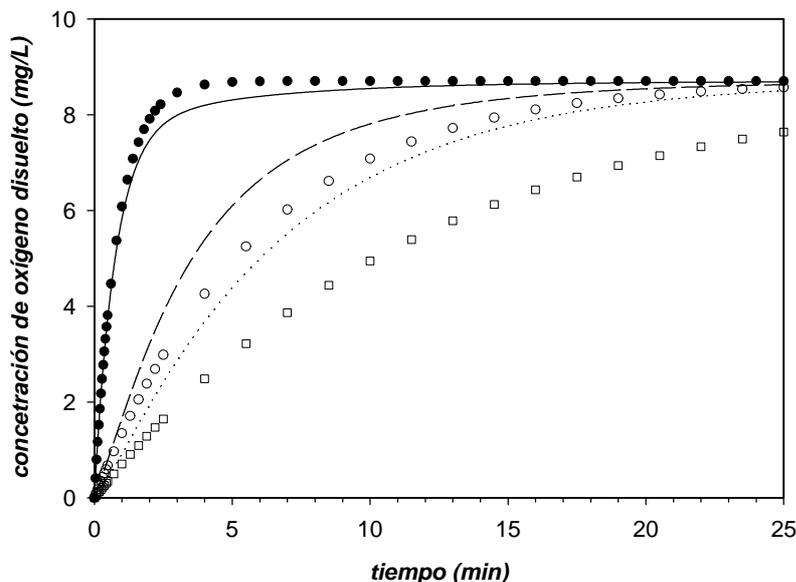


Figura 4.213.- Simulación de los experimentos de determinación del coeficiente K_{La} a partir del modelo de flujo con caudal de recirculación de 4.5 mL/min (— lecho, — — — sección inferior, sección superior). Simulación de la transferencia de oxígeno en cada una de las secciones de forma aislada (● lecho, ○ sección inferior y □ sección superior). Los coeficientes utilizados han sido: $(K_{La})_{lecho} = 0.02 \text{ s}^{-1}$, $(K_{La})_{inferior} = 0.0028 \text{ s}^{-1}$, $(K_{La})_{superior} = 0.0014 \text{ s}^{-1}$.

Método del sulfito

El método químico clásico para la determinación del coeficiente de transferencia de materia de la fase gas a la líquida para el oxígeno (K_{La}) es el denominado método del sulfito. Esta metodología (descrita detalladamente en el capítulo *Materiales y Métodos*), está concebida para ser aplicada a tanques con mezcla perfecta, por tanto, no es posible aplicarla directamente en el caso de las columnas a escala laboratorio. Como se ha discutido anteriormente, el coeficiente K_{La} se espera que sea no homogéneo debido a las diferencias en la geometría de las diferentes secciones del reactor. Además, por otra parte, la concentración de sulfito de cada una de las partes del reactor influirá en las restantes debido al efecto de la mezcla de la fase líquida en el reactor. Por lo tanto, es un requerimiento imprescindible incluir el efecto de la mezcla en la determinación del coeficiente K_{La} .

De este modo, es necesario replantear los balances de materia presentados en la descripción del método para adaptarlos al tipo de reactor objeto de estudio. A partir de las consideraciones tenidas en cuenta en el planteamiento del modelo de flujo (modelo I), los balances de materia para el oxígeno, quedarían (véase también **figura 4.214.**):

$$G_e y_e - G_s y_s = (r_{O_2})_A V_A + (r_{O_2})_B V_B + (r_{O_2})_C V_C \quad (4.226)$$

$$y_A = \frac{A}{1+A}; \quad \text{donde, } A = \frac{y_e - (r_{O_2})_A \frac{V_A}{G_e}}{1 - y_e} \quad (4.227 \text{ y } 4.228.)$$

$$y_B = \frac{A}{1+A}; \quad \text{donde, } A = \frac{y_A - (r_{O_2})_B \frac{V_B}{G_A}}{1 - y_A}; \quad \text{con, } G_A = G_e - (r_{O_2})_A V_A \quad (4.229, 4.230. \text{ y } 4.231.)$$

$$y_s = \frac{A}{1+A}; \quad \text{donde, } A = \frac{y_B - (r_{O_2})_C \frac{V_C}{G_B}}{1 - y_B}; \quad \text{con, } G_B = G_A - (r_{O_2})_B V_B \quad (4.232, 4.233. \text{ y } 4.234.)$$

$$C_A^* = \frac{y_e P_e - y_A P_A}{H \ln \frac{y_e P_e}{y_C P_C}} \quad (4.235.)$$

$$(k_L a)_A = \frac{(r_{O_2})_A}{C_A^*} \quad (4.236.)$$

$$C_B^* = \frac{y_A P_A - y_B P_B}{H \ln \frac{y_A P_A}{y_B P_B}} \quad (4.237.)$$

$$(k_L a)_B = \frac{(r_{O_2})_B}{C_B^*} \quad (4.238.)$$

$$C_C^* = \frac{y_B P_B - y_C P_C}{H \ln \frac{y_B P_B}{y_C P_C}} \quad (4.239.)$$

$$(k_L a)_C = \frac{(r_{O_2})_C}{C_C^*} \quad (4.240.)$$

La constante de Henry (H en Pa·L/mol; He en Pa) se ha corregido teniendo en cuenta la fuerza iónica de la disolución utilizada en los experimentos. A partir del modelo desarrollado por Schumpe *et al.* (1982) para el cálculo de las solubilidades de oxígeno en medios de cultivo, es posible determinar la influencia de la concentración de electrolitos en la solubilidad del oxígeno:

$$\log \frac{He}{He_B} = \sum H_i I_i \quad (4.241.)$$

Donde He_B es la constante de Henry (Pa) en agua pura (tabulada en función de la temperatura), H_i son los parámetros del modelo específicos para cada ion a una temperatura determinada. Y por último, I_i es la fuerza iónica de cada ion, que se calcula como:

$$I_i = \frac{1}{2} c_i z_i^2 \quad (4.242.)$$

Donde c_i es la concentración de un determinado ion en la disolución (mol/L) y z_i es la carga en valor absoluto del ion.

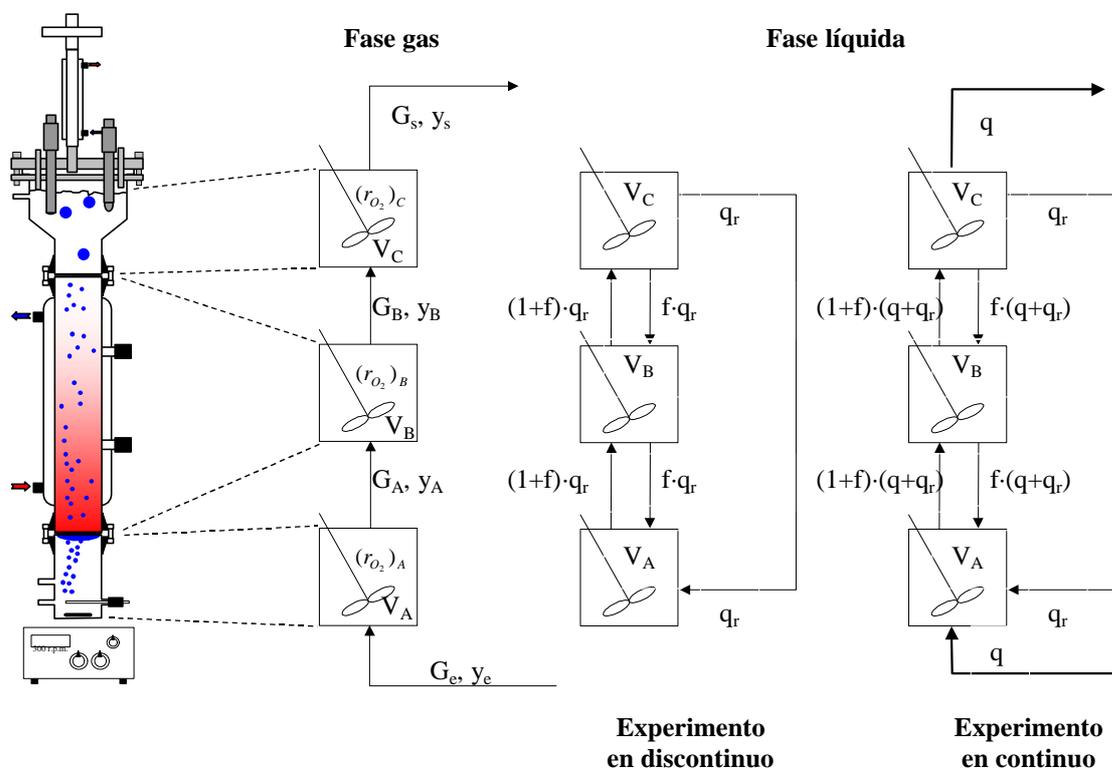


Figura 4.214.- Esquema de la nomenclatura utilizada en los balances de oxígeno para aplicar el método del sulfito. Donde y_i son las fracciones molares de oxígeno en la corriente de gas, de caudal total G_i , V_i es el volumen de líquido de cada una de las partes (A, B, C), y $(r_{O_2})_i$ es la velocidad de consumo de oxígeno (moles de oxígeno por unidad de tiempo y de volumen) en cada una de las secciones del reactor (A, B, C). También se presentan esquemas con la nomenclatura utilizada en los balances de la fase líquida; donde q_r es el caudal de recirculación, q el caudal de alimento, y f el coeficiente de retromezcla.

La fase gas se va empobreciendo en oxígeno a lo largo del reactor, disminuyendo por tanto, su caudal total. Por otra parte, el oxígeno que se transfiere de la fase gas a la líquida reacciona con el sulfito produciéndose sulfato. De esta manera, la concentración de sulfito en cada una de las partes del reactor (notadas como A, B y C), varía debido a dos causas: la reacción con el oxígeno que se transfiere de la fase gas a la líquida y por otra parte, debido a la mezcla de la fase líquida. Los balances de materia para el sulfito en el reactor se pueden plantear a partir del modelo de flujo ya descrito (modelo I).

Experimentos en discontinuo

Si se realizan los experimentos operando con el reactor de forma discontinua (sin entrada ni salida de alimento), los balances para el sulfito son los siguientes (véase también figura 4.214.):

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{1}{V_A} [q_r \cdot C_C + f \cdot q_r \cdot C_B - (1+f) \cdot q_r \cdot C_A] - 2 \cdot (r_{O_2})_A \quad (4.243.)$$

$$\frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{V_B} [(1+f) \cdot q_r \cdot C_A + f \cdot q_r \cdot C_C - (1+2 \cdot f) \cdot q_r \cdot C_B] - 2 \cdot (r_{O_2})_B \quad (4.244.)$$

$$\frac{dC_C}{dt} = \frac{1}{V_C} [(1+f) \cdot q_r \cdot C_B - (1+f) \cdot q_r \cdot C_C] - 2 \cdot (r_{O_2})_C \quad (4.245.)$$

$$\text{Con } (r_{SO_3^{2-}})_i = 2 \cdot (r_{O_2})_i; \quad i = A, B, C \quad (4.246.)$$

Durante los experimentos se determinó la concentración de sulfito en cada instante t , en cada una de las tres partes del reactor (C_A , C_B , C_C). El valor de las variables V_i , q_r , f y V_m es conocido en las condiciones en que se realiza el experimento. Por tanto, es posible construir una función objetivo que mediante el método de mínimos cuadrados permita ajustar la evolución teórica de las concentraciones de sulfito en cada uno de los tanques a la evolución experimental de estas concentraciones determinada experimentalmente a través de valoraciones de las muestras extraídas. Esta optimización se realiza utilizando como parámetros ajustables las incógnitas del anterior sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias de valor inicial: $(r_{O_2})_i$. A partir de estos valores de $(r_{O_2})_i$ se puede evaluar el valor del coeficiente K_{La} en cada una de las secciones del reactor, utilizando las ecuaciones 4.226.- 4.242.

La expresión de la función objetivo utilizada es la que se presenta en la **ecuación 4.247**. Se trata de una función de mínimos cuadrados no lineal ponderada, en la que se impone un mayor peso a los valores del lecho (parte B), ya que el valor del coeficiente de esta sección es el que se quiere determinar con mayor precisión, puesto que es en esta zona del reactor en la que tiene lugar la degradación biológica. En esta ecuación, $y_{i,j}^x$ representan las concentraciones teóricas ($x = \text{teórica}$), experimentales ($x = \text{experimental}$) de la sección A, B y C (para $j = A, B, C$), a diferentes instantes de tiempo t , desde $i = 1, 2, 3, \dots, n$, donde n es el número de puntos experimentales.

$$f_{\text{objetivo}} = 0.25 \cdot \sum_{i=1}^n (y_{i,A}^{\text{teórica}} - y_{i,A}^{\text{experimental}})^2 + 0.5 \cdot \sum_{i=1}^n (y_{i,B}^{\text{teórica}} - y_{i,B}^{\text{experimental}})^2 + 0.25 \cdot \sum_{i=1}^n (y_{i,C}^{\text{teórica}} - y_{i,C}^{\text{experimental}})^2 \quad (4.247.)$$

En la **figura 4.215**, se presenta un esquema de cálculo de la optimización realizada en el que se detallan las operaciones individuales realizadas. De nuevo, como soporte informático para la realización de todos los cálculos se ha utilizado MATLAB (v. 4.2b, The MathWorks, Inc. 1994).

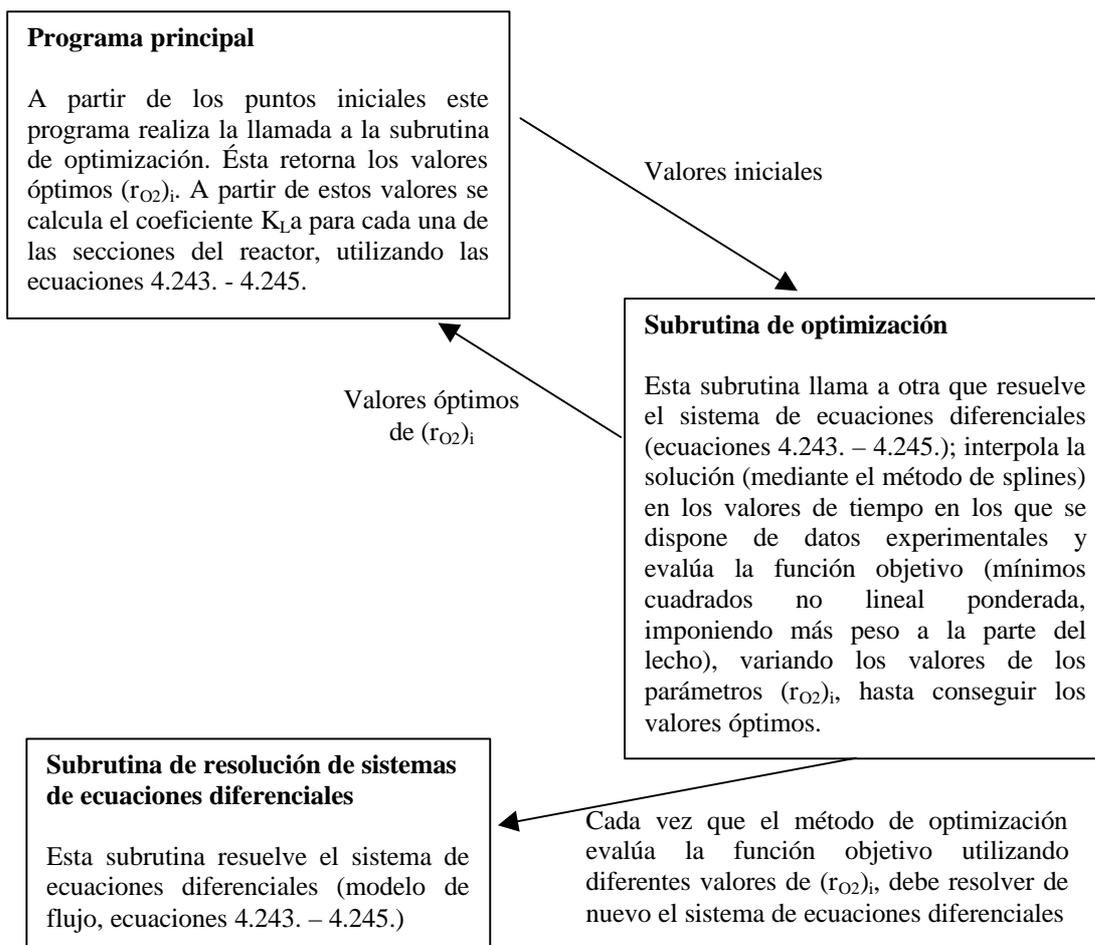


Figura 4.215.- Diagrama de cálculo que muestra la estructura y las funciones de las rutinas principales utilizadas en la optimización de los experimentos en discontinuo de determinación del coeficiente K_{1a} mediante el método químico.

Procedimiento experimental

El reactor vacío se purga de aire con ayuda de nitrógeno. Seguidamente se llena (bajo atmósfera inerte) con una disolución de sulfito de sodio (50-100 g/L). El instante en el que se pone en marcha la aeración es el tiempo cero del experimento. A partir de este instante se extraen muestras de las tres secciones del reactor (véase **figura 4.216.**) sobre atmósfera inerte y se vierten sobre una disolución de yodo (25.38 g/L de I_2 + 70 g/L de KI) con ayuda de una micropipeta. Estas muestras se valoran con tiosulfato de sodio (24.818 g/L). A partir del volumen de tiosulfato requerido en la valoración y con ayuda de la **ecuación 4.248.** se determinan las concentraciones de sulfito en las diferentes secciones del reactor en función del tiempo. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 30 ± 1 °C.

$$C_{SO_3^{2-}} = \frac{C_{I_2} V_{I_2} - 0.5 \cdot C_{S_2O_3^{2-}} V_{S_2O_3^{2-}}}{V} \quad (4.248.)$$

Donde $C_{SO_3^{2-}}$ es la concentración de sulfito en el instante t ; C_{I_2}, V_{I_2} son la concentración de yodo y el volumen (respectivamente), de la disolución sobre la cual se recogen las muestras bajo atmósfera inerte; $C_{S_2O_3^{2-}}$ es la concentración de la disolución de tiosulfito con la que se realizan las valoraciones de las muestras; $V_{S_2O_3^{2-}}$ es el volumen de agente valorante requerido en cada valoración; y por último, V es el volumen de muestra que se vierte sobre la disolución de yodo.

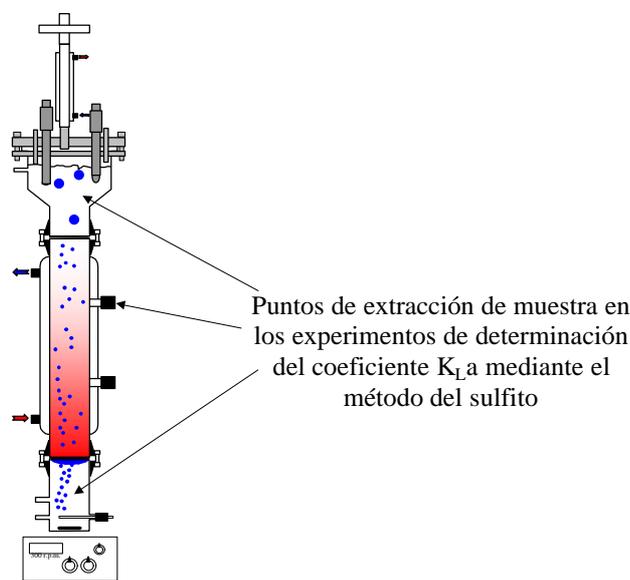


Figura 4.216. Esquema del reactor en el que se indican los puntos de extracción de muestra en el método del sulfito.

Resultados experimentales

Se realizó un experimento en discontinuo utilizando el método del sulfito con un caudal de 40mL/min de aeración y sin recirculación. Los resultados de la optimización se presentan en la **figura 4.217.** y en la **tabla 4.209.** Además se ha realizado un estudio de la bondad de los parámetros ajustados en la optimización, a fin de conocer la precisión y la sensibilidad de los coeficientes determinados (**figura 4.218.**).

Examinando la figura 4.217. se observa que la disminución de la concentración de sulfito en cada una de las secciones del reactor es diferente. La variación de la concentración de sulfito en el experimento se debe principalmente a dos contribuciones: la primera, la transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida y la segunda, a la mezcla de la fase líquida. La mezcla de la fase líquida entre secciones se debe mayoritariamente al

efecto de las burbujas sobre la fase líquida, ya que en este experimento no hay recirculación.

Aunque se ha conseguido un ajuste relativamente satisfactorio, el análisis de sensibilidad realizado (figura 4.218.) pone de manifiesto que el coeficiente K_{La} asociado al lecho es el que ha sido determinado con una mayor precisión, mientras que la influencia de la concentración de sulfito de esta sección afecta de forma importante al resto del reactor, de forma que los coeficientes K_{La} de las secciones inferior y superior poseen escasa precisión.

Por otra parte uno de los inconvenientes de este tipo de determinación es que los parámetros del modelo de flujo utilizados pueden no ser precisos, debido a que los experimentos de distribución del tiempo de residencia se realizaron en continuo. Por este motivo se trató de realizar otra determinación a partir de un experimento en continuo, del cual se habían determinado previamente con exactitud los parámetros del modelo de flujo.

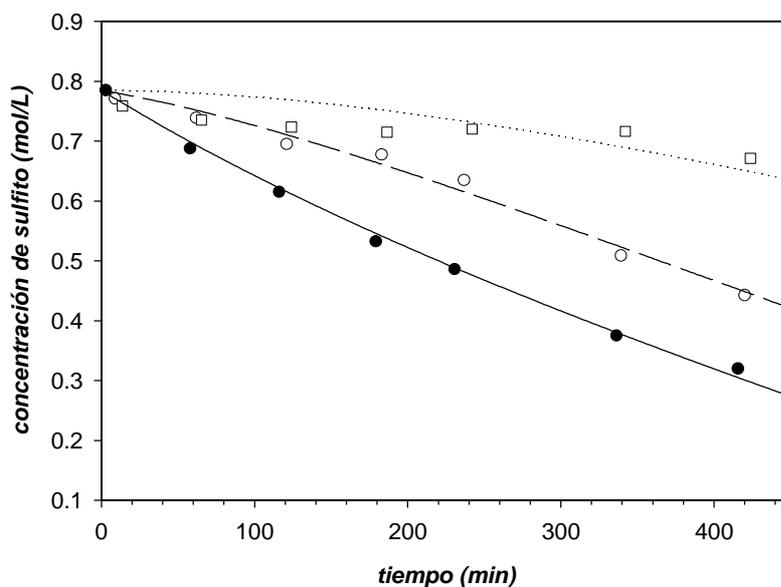


Figura 4.217.- Determinación del coeficiente K_{La} mediante el método del sulfito. Experimento en discontinuo. Puntos experimentales (● lecho, ○ sección inferior, □ sección superior) y ajuste numérico (— lecho, — — — sección superior y sección inferior). Norma del ajuste: 0.046.

Tabla 4.209.- Resultados obtenidos del coeficiente K_{La} de cada una de las secciones del reactor para el experimento tratado en la figura 4.217.

Sección del reactor	K_{La} (s^{-1})
Inferior	0.026
Lecho	0.13
Superior	0.002

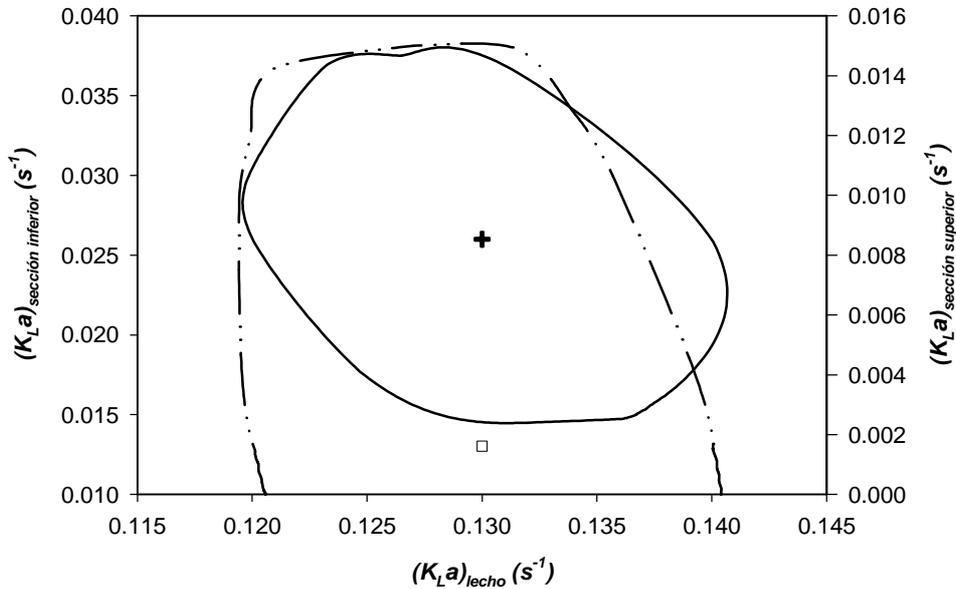


Figura 4.218.- Estimación de las regiones de confianza para un nivel de confianza del 95%. — región de confianza entre el coeficiente K_{La} del lecho y la sección inferior para un valor aproximadamente constante de coeficiente K_{La} de la sección superior de 0.002 s^{-1} (+ valores óptimos de los dos coeficientes). — — — región de confianza entre el coeficiente K_{La} del lecho y la sección superior para un valor constante de coeficiente K_{La} de la sección inferior de 0.026 s^{-1} (□ valores óptimos de los dos coeficientes).

Experimentos en continuo

El reactor opera de forma continua (utilizando agua destilada como alimento), los balances para el sulfito son los siguientes (véase también figura 4.214.):

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{1}{V_A} [q_r \cdot C_C + f \cdot (q + q_r) \cdot C_B - (1 + f) \cdot (q + q_r) \cdot C_A] - 2 \cdot (r_{O_2})_A \quad (4.249.)$$

$$\frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{V_B} [(1 + f) \cdot (q + q_r) \cdot C_A + f \cdot (q + q_r) \cdot C_C - (1 + 2 \cdot f) \cdot (q + q_r) \cdot C_B] - 2 \cdot (r_{O_2})_B \quad (4.250.)$$

$$\frac{dC_C}{dt} = \frac{1}{V_C} [(1 + f) \cdot (q + q_r) \cdot C_B - (1 + f) \cdot (q + q_r) \cdot C_C] - 2 \cdot (r_{O_2})_C \quad (4.251.)$$

$$\text{Con } (r_{SO_3^{2-}})_i = 2 \cdot (r_{O_2})_i; \quad i = A, B, C \quad (4.252.)$$

El esquema de cálculo es idéntico al de los sistemas en discontinuo, excepto en las ecuaciones que definen el flujo, que en vez de ser 4.243. – 4.245. (experimentos en discontinuo), son las ecuaciones 4.249. – 4.251.

El procedimiento experimental empleado ha sido básicamente el mismo, pero utilizando una concentración de sulfito de sodio superior: 100-150 g/L (debido a que el experimento se realiza en continuo y por tanto el descenso de la concentración de sulfito es

más acusado). El agua que se utiliza para alimentar el continuo se desgasifica y se mantiene en atmósfera inerte mediante un burbujeo constante de nitrógeno.

Se realizó un experimento con caudal de aeración de 40 mL/min y caudal de recirculación de 4.5 mL (temperatura 30 °C). Los resultados de la optimización se presentan en la **figura 4.219**, y en la **tabla 4.210**. Se ha realizado un estudio de la bondad de los parámetros ajustados en la optimización, a fin de conocer la precisión y la sensibilidad de los coeficientes determinados (**figura 4.220**).

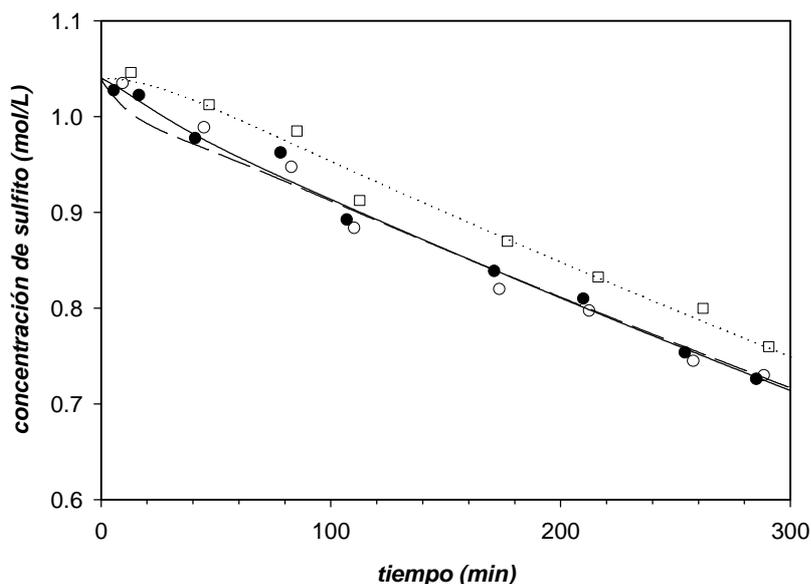


Figura 4.219.- Determinación del coeficiente K_{La} mediante el método del sulfito. Experimento en continuo. Puntos experimentales (● lecho, ○ sección inferior, □ sección superior) y ajuste numérico (— lecho, — — sección superior y sección inferior). Norma del ajuste: 0.037.

Tabla 4.210.- Resultados obtenidos del coeficiente K_{La} de cada una de las secciones del reactor

Sección del reactor	K_{La} (s^{-1})
Inferior	0.024
Lecho	0.077
Superior	0.002

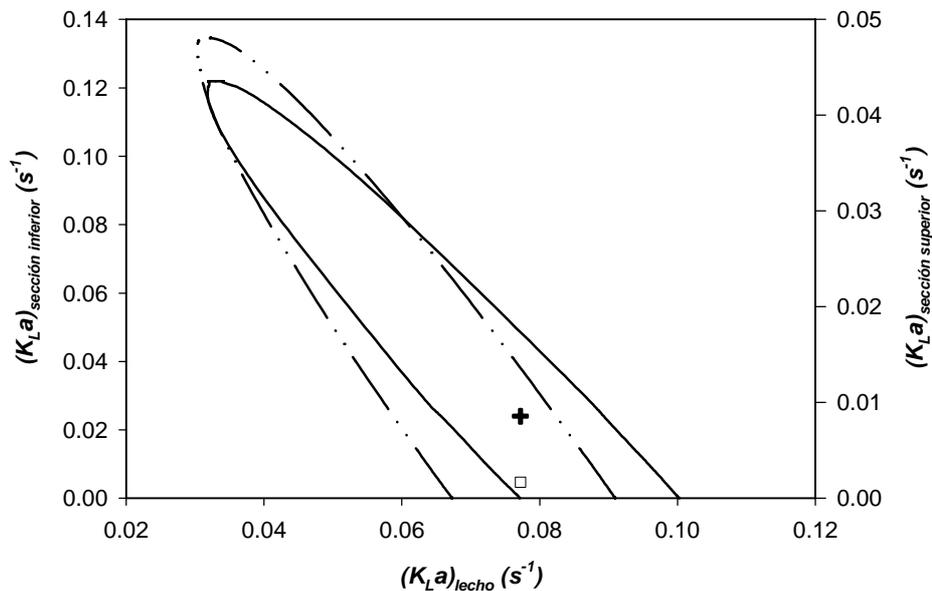


Figura 4.220.- Estimación de las regiones de confianza para un nivel de confianza del 95%. — región de confianza entre el coeficiente K_{La} del lecho y la sección inferior para un valor aproximadamente constante de coeficiente K_{La} de la sección superior de 0.002 s^{-1} (+ valores óptimos de los dos coeficientes). - - - región de confianza entre el coeficiente K_{La} del lecho y la sección superior para un valor constante de coeficiente K_{La} de la sección inferior de 0.024 s^{-1} (□ valores óptimos de los dos coeficientes).

En las mismas condiciones del experimento de determinación del coeficiente K_{La} en continuo mediante el método del sulfito (figura 4.219.) se ha realizado un experimento de distribución del tiempo de residencia (denominado experimento 2 en el apartado 4.2.1.3.), por lo que en este caso, los parámetros del modelo de flujo se conocían con precisión. Además un experimento en continuo resulta mucho más representativo, puesto que en la nitrificación biológica la operación se mantiene en modo continuo.

En cambio, uno de los inconvenientes de realizar un experimento en continuo es que este tipo de operación afecta de forma directa a la variación de la concentración de sulfito, por lo que disminuye la sensibilidad de los parámetros ajustados en la optimización.

Aunque la norma del ajuste ha sido menor (por tanto el ajuste realizado es mejor), la bondad de los coeficientes volumétricos de transferencia determinados es notablemente menor (véase figura 4.218.) si se compara con el experimento anterior.

Los coeficientes determinados mediante la metodología descrita demuestran que el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida varía de forma importante a lo largo del reactor.

El método del sulfito tiene, no obstante, algunos inconvenientes. En primer lugar la solución no puede aproximar las propiedades del caldo de cultivo cambiante en composición al cambiar las condiciones de operación, además, las concentraciones utilizadas tiene una fuerza iónica suficientemente elevada que puede afectar al área interfacial y en menor grado al coeficiente de transferencia de materia (van't Riet, 1979). Por otra parte, la reacción se considera de orden cero respecto al sulfito, pero la reacción no es suficientemente rápida y la reacción se produce en la película de líquido que rodea a las burbujas, provocando un descenso del grosor aparente de película, lo cual produce sistemáticamente errores por exceso en los valores del coeficiente volumétrico de transferencia de materia elevados (Blanch y Clark, 1996).

A pesar del posible error asociado a la metodología y de los resultados del estudio realizado de las regiones de confianza de los parámetros determinados, el valor de coeficiente K_{La} asociado al lecho se puede considerar como una estimación válida al valor de coeficiente sin presencia de biopelícula sobre el soporte. El valor del coeficiente en el lecho una vez la biopelícula esté desarrollada se estimará mediante un método directo a partir de los resultados de la operación del reactor (véase sección 4.2.2.3.).

Aunque se haya utilizado un método relativamente indirecto, en un sistema muy complejo, la incorporación del modelo de flujo al análisis del coeficiente K_{La} permite demostrar que existen diferencias importantes del valor del coeficiente en las distintas secciones, y además, obtener una primera aproximación del coeficiente en la parte central del reactor (lecho). Por otra parte, la diferencia notable entre el valor obtenido aplicando esta metodología y el determinado de forma global inicialmente, de prácticamente un orden de magnitud, permite corroborar el análisis efectuado anteriormente sobre la poca representatividad de una determinación global.

4.2.2.- Resultados de operación

Los experimentos realizados en los reactores a escala laboratorio persiguen principalmente dos finalidades: primero, determinar si el sistema es suficientemente robusto como para que su operación pueda ser integrada sin problemas dentro del bucle MELISSA; y segundo, estudiar con detalle el efecto de las variables que afectan al proceso de nitrificación, de forma que un mayor conocimiento del sistema y del proceso, permitan desarrollar un control efectivo del compartimento, y por tanto del bucle en su conjunto.

Debido a la relativa escasa instrumentación de estos reactores (ya comentada en el capítulo *Materiales y Métodos*), las variables que se han estudiado son las siguientes: carga amoniacal (tanto influencia del tiempo de residencia, como de la concentración del alimento), caudal de aeración y efecto del caudal de recirculación.

Uno de los hechos importantes que cabe remarcar es la imposibilidad de determinar en tiempo real de modo experimental la concentración de células en el reactor, y por supuesto las poblaciones relativas de cada una de las dos cepas bacterianas. En el único momento en que es posible determinar la cantidad de biomasa existente en el reactor es una vez parada la operación. Por tanto, y debido a este hecho, todos los resultados aportados son expresados en forma volumétrica (por unidad de volumen total de reactor), y no por unidad de masa de células.

4.2.2.1.- Condiciones experimentales

Las condiciones que se mantuvieron constantes durante todos los experimentos fueron las siguientes: oscuridad, temperatura de 30 ± 1 °C, pH del punto de consigna de 8.1 ± 0.1 y una velocidad de agitación de 300 r.p.m en la parte inferior. El resto de condiciones de operación: concentración de amonio en el alimento, caudal de alimento, caudal de recirculación y caudal de aeración, se fijan de forma individual en cada uno de los experimentos, de acuerdo con los objetivos de los mismos.

4.2.2.2.- Puesta en marcha

La puesta en marcha de estos reactores es lenta, como ya se ha descrito en el capítulo introductorio. Se seleccionó una velocidad de dilución durante los periodos de puesta en marcha del orden de la velocidad máxima de crecimiento de los microorganismos (aproximadamente 2 días de tiempo de duplicación, Prosser, 1989), de esta manera se estimula la inmovilización de las bacterias (van Loosdrecht y Heijnen, 1993), y por otra parte se reduce el riesgo de contaminación celular. La concentración inicial de amonio en el alimento es de 300 mg N-NH₄⁺/L, y la composición del medio es la descrita en el capítulo *Materiales y Métodos*, pero la esterilización se realiza por filtración (0.22 µm, Opticap filter / Millipore / Bedford, MA, USA) en vez de mediante vapor.

El inóculo utilizado es el producido en los cultivos en el biorreactor de 2 L, en suspensión (véase apartado 4.1.), con un volumen aproximado de 150 mL. La duración aproximada de la puesta en marcha hasta conseguir la colonización de las partículas y el posterior desarrollo de la biopelícula ha sido de entre 30 y 50 días.

En la **figura 4.221**, se muestra el seguimiento de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el efluente durante el aumento de la carga amoniacal aplicada a los reactores en la fase de formación de biopelícula, en uno de los reactores de escala laboratorio.

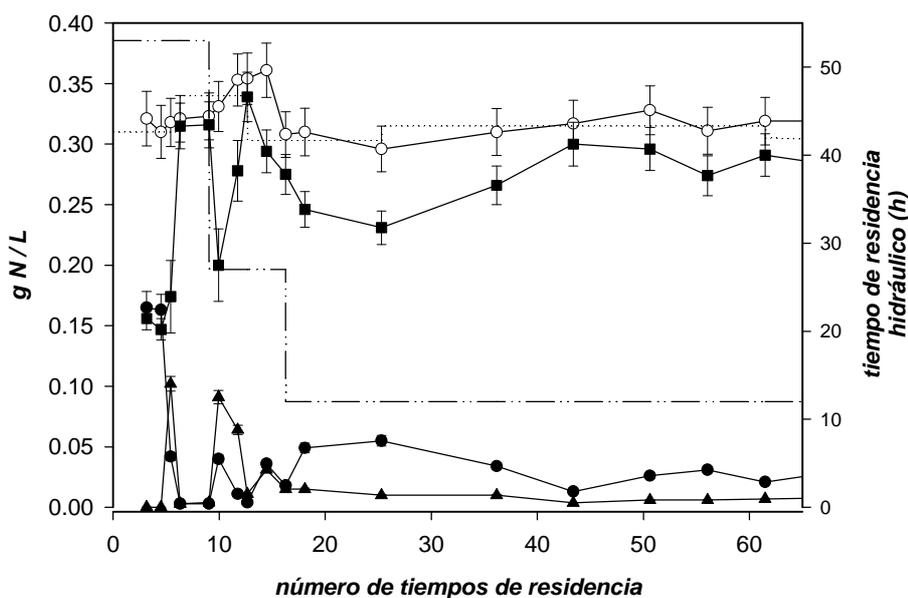


Figura 4.221.- Puesta en marcha de uno de los reactores a escala laboratorio. Evolución de las concentraciones de amonio (●), nitrito (▲), nitrato (■), y nitrógeno total (○ suma de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato experimentales). concentración de amonio del alimento, - · - tiempo de residencia (volumen de líquido/caudal de alimento).

Durante el periodo de formación de la biopelícula, se apreció en todos los casos que el inicio del desarrollo de la biopelícula se centraba en la parte inferior del lecho, y de ahí se desplazaba al resto del lecho. En la **figura 4.222**, se presenta una fotografía del montaje experimental de las columnas a escala laboratorio, pudiéndose observar que la biopelícula se observa desarrollada a lo largo de todo el lecho, y pudiéndose comparar el aspecto de las columnas en operación (izquierda) con una sin inocular (derecha).

4.2.2.3.- Resultados de los experimentos

Una vez se considera que la fase inicial de formación de la biopelícula se ha conseguido, se comienzan las perturbaciones del proceso para estudiar la respuesta del sistema. Se realiza un seguimiento de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato, tanto en los periodos transitorios como en los estados estacionarios (o más correctamente pseudoestacionarios si se tiene en cuenta que la biopelícula tiene siempre cierta dinámica).

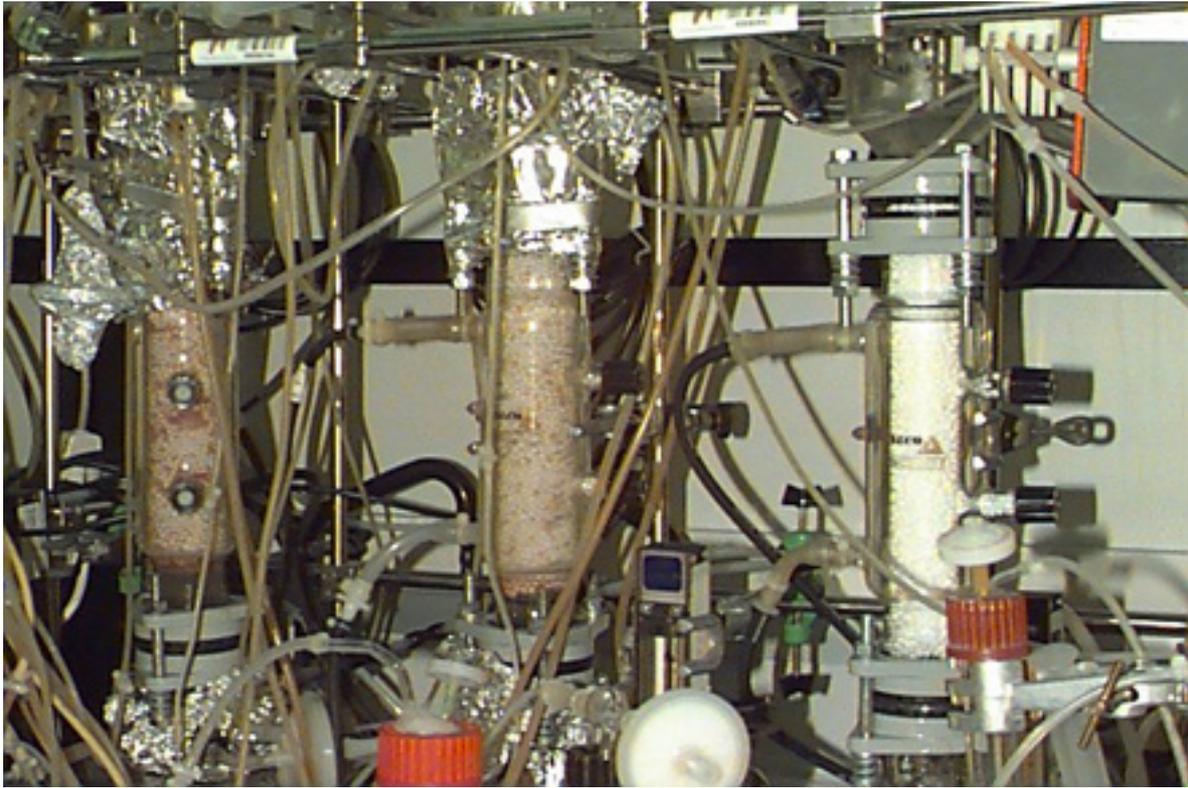


Figura 4.222.- Montaje experimental de los reactores a escala laboratorio. Las dos columnas de la izquierda están en operación con la biopelícula desarrollada a lo largo de todo el lecho, mientras que la columna de la derecha no contiene células, pudiéndose observar el aspecto de las partículas de soporte (Biostyr®) sin colonizar.

Carga máxima alcanzada

La carga amoniacal alimentada al reactor se aumentó progresivamente para estudiar cual era la máxima capacidad de nitrificación del reactor. La carga volumétrica se evalúa a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Carga amoniacal} = \frac{[N - NH_4^+]_{\text{alimento}}}{\theta} \quad (\text{kg } N - NH_4^+ \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{día}^{-1}) \quad (4.253.)$$

Donde $[NNH_4^+]_{\text{alimento}}$ es la concentración de amonio en el alimento, y θ es el tiempo de residencia: volumen total de reactor/caudal volumétrico de alimento.

Los estados estacionarios obtenidos se presentan en la **tabla 4.213.**, en la que se detallan las condiciones de cada uno de los experimentos. Esta serie de resultados se obtuvo con experimentos en diferentes columnas (a escala laboratorio), que estuvieron operando durante un periodo entre 200 y 500 días. El caudal de recirculación utilizado ha sido de 4.5 mL/min.

La carga máxima alcanzada (con elevada eliminación) es, por tanto, de 0.55 kg N-NH₄⁺ · m⁻³ · día⁻¹. Las capacidades de degradación de este tipo de sistemas (denominados lechos flotantes) se sitúa entre 0.5-1.5 kg N-NH₄⁺ · m⁻³ · día⁻¹ en otros trabajos publicados, para un área específica de reactor (área de soporte / volumen de reactor) de entre 300 y 700 m²/m³ (Martins dos Santos *et al.*, 1998). En este tipo de reactores la capacidad de nitrificación está limitada precisamente por el área específica (Campos, 2000, Martins dos Santos *et al.*, 1998). La comparación entre reactores se hace difícil debido a dos causas: las condiciones de operación, y por otra parte, que al referir las capacidades de nitrificación al volumen de reactor, no se tiene en cuenta la relación volumen de lecho/volumen de reactor, más específicamente, superficie de soporte/volumen de reactor. Por esta razón, los valores de capacidad de degradación, además de estar asociados, por supuesto, a las condiciones de operación (pH, temperatura), también están directamente relacionados con el área específica. En los reactores de escala laboratorio se ha estimado que el área específica es del orden de 300 m²/m³ (como ya se ha visto en el apartado 4.2.1.1.), por tanto es razonable que el valor máximo alcanzado de capacidad de nitrificación se encuentre en la parte baja del rango citado. Si se transforman las unidades de carga utilizadas a kg N-NH₄⁺ · m⁻² · día⁻¹, se obtendría un valor de carga experimental de 1.8 · 10⁻³ kg N-NH₄⁺ · m⁻² · día⁻¹, mientras que el bibliográfico sería del orden de 1.7 · 10⁻³ kg N-NH₄⁺ · m⁻² · día⁻¹. En definitiva se comprueba que la carga máxima alcanzada concuerda con los antecedentes previos en sistemas similares.

Tabla 4.213.- Estados estacionarios alcanzados en los reactores a escala laboratorio para conseguir alcanzar la carga máxima, los valores de carga están calculados por unidad de volumen de reactor. La carga total eliminada se refiere a la convertida a nitrato.

Concentración del alimento (g N-NH ₄ ⁺ / L)	Caudal de aeración (mL/min)	Carga de amonio a la entrada (kg N · m ⁻³ · día ⁻¹)	Carga de amonio a la salida (kg N · m ⁻³ · día ⁻¹)	Carga de nitrito a la salida (kg N · m ⁻³ · día ⁻¹)	Carga de amonio eliminada (%)	Carga total eliminada (%)
0.300	9	0.42	0.061	0.011	85.3	82.7*
0.300	15	0.42	0.035	0.007	91.6	89.9*
0.400	9	0.55	0.081	0.042	85.3	77.7*
0.300	40	0.55	0.002	0.0005	99.7	99.6
0.300	40	1.11	0.185	0.168	83.3	68.2
0.300	100	0.55	0.002	0.0002	99.7	99.6
0.300	100	1.11	0.244	0.056	77.9	72.8
0.300	250	1.11	0.236	0.061	78.7	73.2

Necesidades de aeración

Para estudiar el efecto del caudal de oxígeno disuelto sobre la nitrificación se realizaron diferentes experimentos realizando un aumento de la carga (de 0.55 a 1.11 kg N-NH₄⁺ · m⁻³ · día⁻¹), a diferentes caudales de aeración constantes a lo largo del experimento. La evolución de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato se presentan en las **figuras 4.223.** (40 mL/min de caudal de aeración) y **4.224.** (100 mL/min de caudal de aeración).

* Estos experimentos están realizados en la primera fase de operación de los reactores, por lo que no se descarta que la biopelícula estuviese insuficientemente desarrollada.

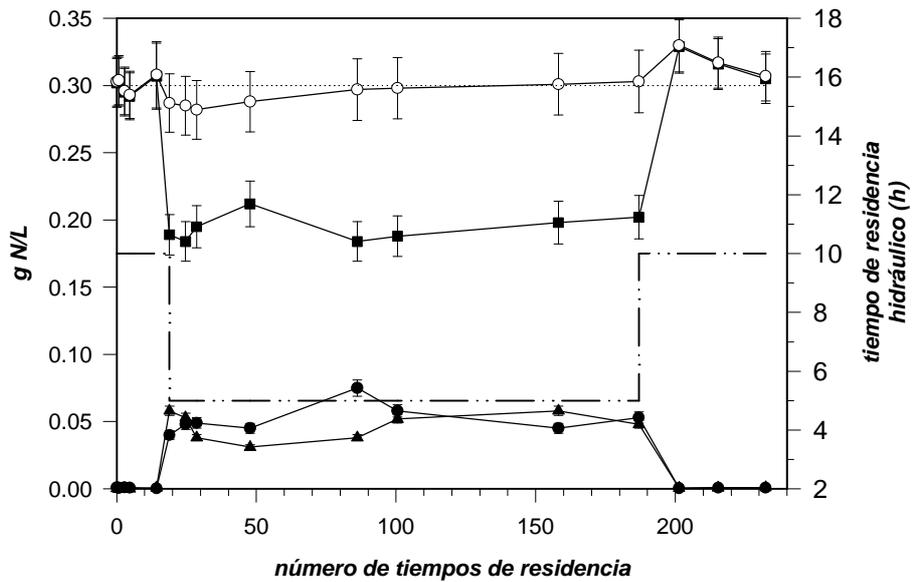


Figura 4.223.- Perturbación en escalón del tiempo de residencia hidráulico (volumen de líquido/caudal de alimento), caudal de aeración de 40 mL/min. Evolución de las concentraciones de amonio (●), nitrito (▲), nitrato (■), y nitrógeno total (○ suma de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato experimentales). concentración de amonio del alimento, - · - · tiempo de residencia (volumen de líquido/caudal de alimento).

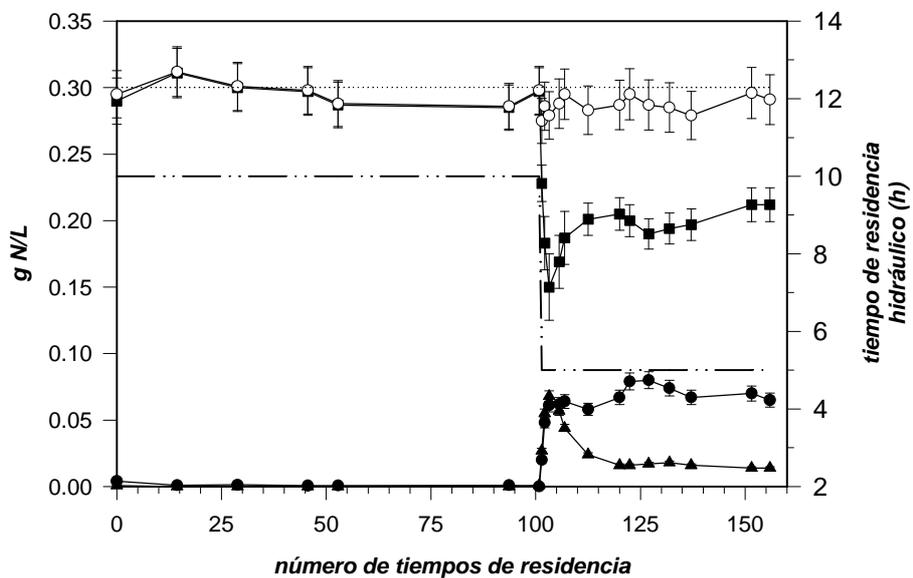


Figura 4.224.- Perturbación en escalón del tiempo de residencia hidráulico (volumen de líquido/caudal de alimento), caudal de aeración de 100 mL/min. Evolución de las concentraciones de amonio (●), nitrito (▲), nitrato (■), y nitrógeno total (○ suma de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato experimentales). concentración de amonio del alimento, - · - · tiempo de residencia (volumen de líquido/caudal de alimento).

Examinando estas gráficas así como los valores de degradación de carga y conversión que se han presentado en la tabla 4.213., se observa que después de aumentar al doble el valor de carga (de 0.55 a 1.11 kg N-NH₄⁺ · m⁻³ · día⁻¹), la eliminación disminuye de forma importante, aumentando las concentraciones de amonio y nitrito, esto es debido a que existe una limitación que impide que tenga lugar una degradación mayor.

En el experimento de la figura 4.221., que se realiza con un caudal de aeración de 40 mL/min, el nitrito residual es de aproximadamente 46 ppm. En las mismas condiciones pero con un caudal de aeración de 100 mL/min, el nitrito residual es aproximadamente de 25 ppm, esto significa que parte de la limitación existente en el primer experimento es debido a la falta de oxígeno. El periodo de tiempo después de la perturbación en el primer experimento (figura 4.221.) es de aproximadamente 170 tiempos de residencia (35 días), por lo que queda descartado que la biopelícula pueda adaptarse a las nuevas condiciones.

Por otra parte, si se determina el cociente:

$$\frac{\text{aporte de oxígeno en fase gas al reactor}}{\text{carga de amonio}} = \frac{\text{mol } O_2 / \text{min}}{\text{mol } NH_4^+ / \text{min}} \quad (4.254.)$$

Y se evalúa para los experimentos de la tabla 4.213., se obtienen los resultados presentados en la **tabla 4.214.** A partir de estos resultados se observa que para una relación mol O₂ / mol NH₄⁺ ≤ 11 existe limitación por oxígeno, mientras que en los casos en que el cociente es superior a 20 el aporte de oxígeno no resulta limitante.

Considerar el cociente de la expresión 4.254. como válido para determinar las limitaciones por oxígeno en el reactor significa suponer que la fuerza impulsora (C* - C) no varía de forma acusada, y lo que es más importante, suponer que el caudal de aeración en el rango de estudio (0-250 mL/min) es proporcional al coeficiente K_La. Con estas aproximaciones se consigue reducir al máximo la complejidad de la dependencia de las necesidades de aeración con la transferencia de oxígeno, y por consiguiente con el coeficiente K_La.

Tabla 4.214.- Estudio de las necesidades de aeración en los reactores a escala laboratorio. En la relación mol O₂ / mol NH₄⁺, la cantidad de oxígeno se refiere a la fase gas (condiciones normales). Las celdas sombreadas representan experimentos en los que existe limitación por oxígeno.

Caudal de aeración (mL/min)	Carga de amonio a la entrada (kg N · m ⁻³ · día ⁻¹)	Carga de amonio eliminada (%)	Carga total eliminada (%)	$\frac{\text{mol } O_2}{\text{mol } NH_4^+}$	Tipo de limitación
9	0.42	85.3	82.7	6.3	aporte de O ₂
15	0.42	91.6	89.9	10.5	aporte de O ₂
9	0.55	85.3	77.7	4.7	aporte de O ₂
40	0.55	99.7	99.6	21.0	(Concentración de amonio)
40	1.11	83.3	68.2	10.5	aporte de O ₂ + área de biopelícula
100	0.55	99.7	99.6	52.5	(Concentración de amonio)
100	1.11	78.3	73.0	26.3	área de biopelícula
250	1.11	78.7	73.2	65.6	área de biopelícula

Estimación del coeficiente K_{La} mediante un método directo

Diversos autores han determinado que a bajas concentraciones de oxígeno disuelto existe acumulación de nitrito, limitándose la nitrificación (Hanaki *et al.*, 1990b; Garrido *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 1998, Campos, 2000). La concentración de oxígeno disuelto aproximada a partir de la cual aparece acumulación de nitrito en procesos de nitrificación en biopelícula es de 2.5 ppm (Garrido *et al.*, 1997; Joo *et al.*, 2000). Suponiendo un rango entre 0 - 2.5 ppm de concentración de oxígeno disuelto es posible estimar el coeficiente de transferencia de oxígeno K_{La} mediante un método directo (Kargi y Moo-Young, 1985; **ecuación 4.255.**), para los experimentos en que exista limitación por aporte de oxígeno (los resultados se presentan en la **tabla 4.215.**). El coeficiente resultante de esta estimación es el valor del coeficiente en el lecho, que es la sección del reactor en la que se está produciendo la biotransformación.

$$K_{La} = \frac{Y_{NO_2^-} \cdot r_{NO_2^-} + Y_{NO_3^-} \cdot r_{NO_3^-}}{(C^* - C)} \quad (4.255.)$$

Donde Y_i son los parámetros estequiométricos teóricos de la oxidación de amonio a nitrito ($1.5 \text{ mol O}_2 / \text{mol NO}_2^-$) y de amonio a nitrato ($2 \text{ mol O}_2 / \text{mol NO}_3^-$), r_i son los flujos de nitrito y nitrato del efluente; C^* es la concentración de saturación de oxígeno en la fase líquida, y C la concentración de oxígeno disuelto en estado estacionario (que se supone en el rango 0 - 2.5 ppm, como ya se ha mencionado).

Tabla 4.215.- Estimación del coeficiente K_{La} en el lecho mediante un método directo en los experimentos en que existe limitación por aporte de oxígeno.

Caudal de aeración (mL/min)	Carga de amonio a la entrada (kg N · m ⁻³ · día ⁻¹)	Carga de amonio eliminada (%)	Carga total eliminada (%)	$\frac{\text{mol O}_2}{\text{mol NH}_4^+}$	Rango de K_{La} (s ⁻¹) (método directo)
9	0.42	85.3	82.7	6.3	[1.4 – 2.0] · 10 ⁻²
15	0.42	91.6	89.9	10.5	[1.5 – 2.1] · 10 ⁻²
9	0.55	85.3	77.7	4.7	[1.8 – 2.6] · 10 ⁻²
40	1.11	83.3	68.2	10.5	[2.1 – 3.1] · 10 ⁻²

La concentración de saturación se ha determinado a partir de la constante de Henry modificada por la fuerza iónica de la disolución (a partir del método propuesto por Schumpe *et al.*, 1982, ya descrito en las ecuaciones 4.241. y 4.242.). Además, la concentración de saturación se ha corregido para tener en cuenta el efecto de la presión mediante la expresión (propuesta por Sekizawa *et al.*, 1985):

$$C_{\text{corregida}}^* = C^* \left[1 + \frac{\mathbf{r} \cdot g}{P_{\text{atm}}} \frac{1 - \mathbf{e}_g}{1 - \mathbf{e}_p} (h - l) \right] \quad (4.256.)$$

Donde \mathbf{r} es la densidad del líquido (kg/m³), g la aceleración de la gravedad (m/s²), P_{atm} la presión atmosférica (Pa), \mathbf{e}_g la fracción de gas, \mathbf{e}_p la fracción de sólido en el reactor, h la profundidad del difusor y l la distancia desde el difusor, ambas en metros.

Fujie *et al.* (1992) estudiaron el coeficiente volumétrico de transferencia en un biorreactor de lecho fijo y determinaron que es función de la concentración de biopelícula en el reactor. Demostraron que el coeficiente K_{La} es menor al aumentar la concentración de biomasa en el reactor. El valor de coeficiente se reducía a la mitad si se comparaba el valor obtenido en el reactor antes de su inoculación con el valor del coeficiente cuando la biopelícula estaba completamente desarrollada.

En los datos obtenidos en estos experimentos también se observa la misma tendencia, si se compara el valor obtenido en la estimación del coeficiente de transferencia para el lecho mediante los experimentos del sulfito (véase apartado 4.2.1.5.) se observa que éste es mayor: 0.077 s^{-1} (para un caudal de aeración de 40 mL/min y una recirculación de 4.5 mL/min).

Por otra parte, en los casos en los que la velocidad superficial del líquido es relativamente menor a la del gas, se pueden establecer correlaciones que tienen una forma del tipo (Carberry y Varma, 1986):

$$K_{La} = a \cdot u_G^b \quad (4.257.)$$

Donde a y b son parámetros y u_G es la velocidad superficial del gas. Si a partir de los valores estimados de coeficiente se correlaciona éste con la velocidad del gas, se obtiene la siguiente ecuación (véase **figura 4.225.**):

$$K_{La} = 0.082 \cdot u_G^{0.35} \quad (4.258.)$$

Con u_G en cm/s y K_{La} en s^{-1} .

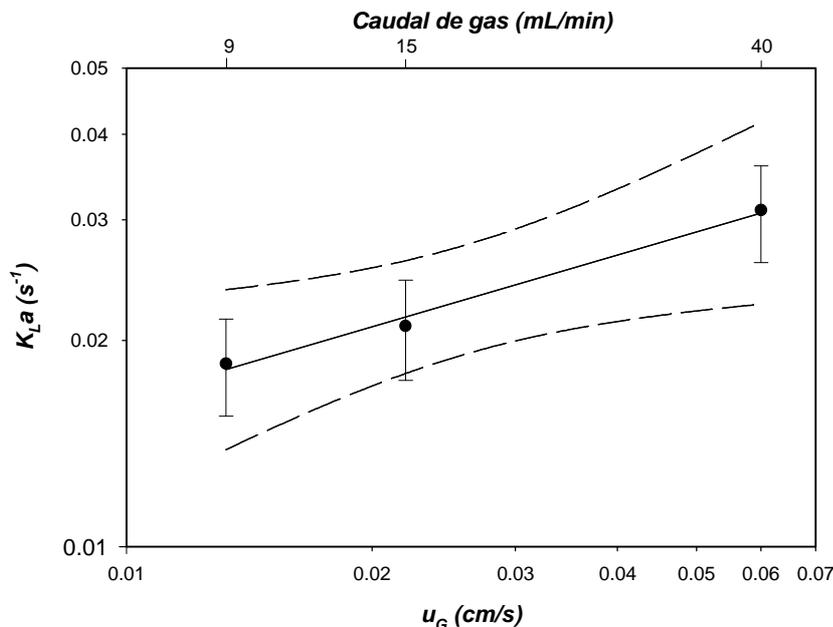


Figura 4.225.- Correlación entre el coeficiente K_{La} y la velocidad superficial del gas. La línea discontinua (— — —) representa la bondad del ajuste para un nivel de confianza del 95 %.

La correlación presentada en la ecuación 4.258. permite disponer de una primera aproximación del valor del coeficiente K_{La} en los reactores a escala laboratorio con biopelícula desarrollada en el rango de caudal de aeración estudiado

Efecto de la recirculación

Para estudiar el efecto de la recirculación se realizó un experimento en el que se mantenían constantes todas las condiciones de operación a excepción de la relación de recirculación externa. El objetivo de este experimento es determinar el efecto de la recirculación en la variación de concentración de amonio, nitrito y nitrato a lo largo del reactor y en particular para ello se sigue la concentración de amonio, nitrito y nitrato a través de las tomas de muestra laterales, además de a la salida del reactor. Los estados estacionarios obtenidos se presentan en la **tabla 4.216.**, y en la **figura 4.226.**

Tabla 4.216.- Resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la relación de recirculación.

Caudal de recirculación (mL/min)	Relación de recirculación ($q_{rec}:q_{alimento}$)	Carga de amonio a la entrada ($kg\ N \cdot m^{-3} \cdot día^{-1}$)	Carga de amonio a la salida ($kg\ N \cdot m^{-3} \cdot día^{-1}$)	Carga de nitrito a la salida ($kg\ N \cdot m^{-3} \cdot día^{-1}$)	Carga de amonio eliminada (%)	Carga total eliminada (%)
4.5	5:1	0.55	0.0018	0.0012	99.7	99.5
1.7	2:1	0.55	0.0014	0.0003	99.8	99.7

No se aprecian cambios significativos en la conversión obtenida en las condiciones del experimento. Las diferencias entre las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato a lo largo del reactor son mínimas (figura 4.226.), lo cual demuestra que el grado de mezcla del reactor es elevado, tal y como había puesto de manifiesto mediante los estudios de distribución del tiempo de residencia (apartado 4.2.1.2.).

Por otra parte, el seguimiento del pH durante el experimento, muestra que el pH se mantiene controlado en la sección superior del reactor (donde se halla la sonda de pH y donde se realizan las adiciones de base). Sin embargo, cuando existe una relación de recirculación poco elevada (caudal de recirculación / caudal de alimento 2/1), el pH en el lecho disminuye de forma importante. Esto es debido a la influencia de la recirculación en el grado de mezcla del reactor, lo que justifica trabajar con una elevada relación de recirculación para favorecer la mezcla, y eliminar así, gradientes de pH a lo largo del lecho que podrían provocar descensos en la capacidad de nitrificación.

Efectos de inhibición durante los experimentos

Tal y como se ha comentado en el capítulo introductorio, tanto *Nitrosomonas europaea* como *Nitrobacter winogradskyi* pueden sufrir inhibición por la presencia de amoniaco libre y/o ácido nitroso (Anthonisen *et al.*, 1976). Si se evalúan las concentraciones de estas dos especies en las condiciones utilizadas de pH y temperatura (véase apéndice), es posible determinar en qué experimentos existe inhibición. Los resultados se presentan en la **tabla 4.217.** y en la **figura 4.227.**

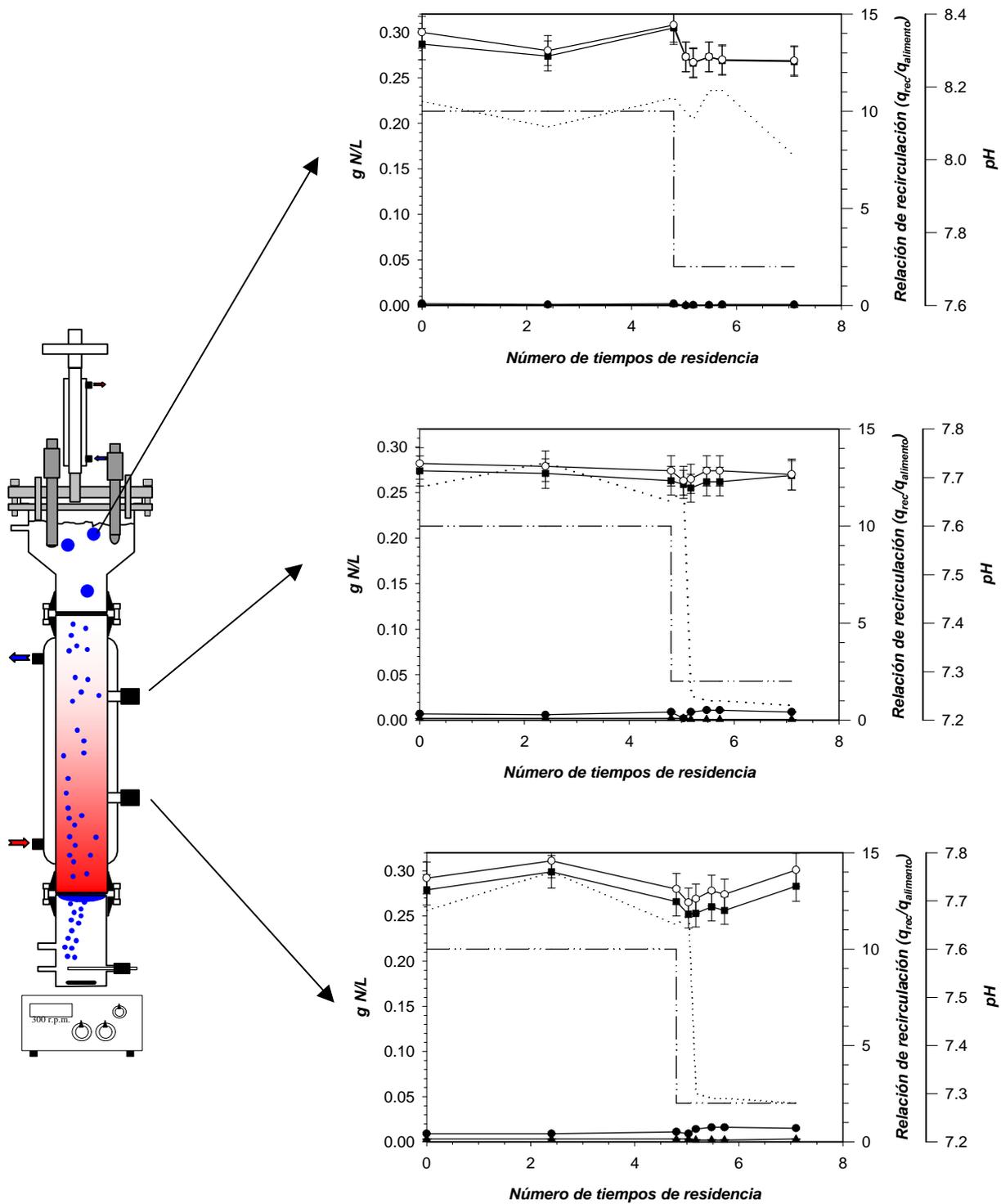


Figura 4.226.- Perturbación en escalón del caudal de recirculación de líquido, el tiempo de residencia hidráulico es de 10 horas. Evolución de las concentraciones de amonio (●), nitrito (▲), nitrato (■), y nitrógeno total (○ suma de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato experimentales). pH, --- relación de recirculación utilizada.

Tabla 4.217.- Determinación de las concentraciones de amoníaco y ácido nitroso durante los estados estacionarios de los experimentos, especies a las cuales afecta la inhibición según Anthonisen et al. (1976). Las celdas sombreadas resaltan aquellos casos en los que existe inhibición de alguna de las especies bacterianas.

Caudal de aeración (mL/min)	Carga de amonio a la entrada (kg N·m ⁻³ ·día ⁻¹)	Carga total eliminada (%)	Tipo de limitación	N-HNO ₂ mg/L	N-NH ₃ mg/L	Especie inhibida
9	0.42	82.7	aporte de O ₂	3.1·10 ⁻⁴	6.44	<i>Nitrobacter</i>
15	0.42	89.9	aporte de O ₂	2.1·10 ⁻⁴	3.49	<i>Nitrobacter</i>
9	0.55	77.7	aporte de O ₂	1.3·10 ⁻³	8.08	<i>Nitrobacter</i>
40	0.55	99.6	(Concentración de amonio)	1.1·10 ⁻⁵	0.14	--
40	1.11	68.2	aporte de O ₂ + área de biopelícula	1.9·10 ⁻³	6.89	<i>Nitrobacter</i>
100	0.55	99.6	(Concentración de amonio)	4.1·10 ⁻⁶	0.14	--
100	1.11	73.0	área de biopelícula	6.6·10 ⁻⁴	8.95	<i>Nitrobacter</i>
250	1.11	73.2	área de biopelícula	6.8·10 ⁻⁴	8.80	<i>Nitrobacter</i>
75	0.55	99.5	(Concentración de amonio)	2.6·10 ⁻⁴	0.02	--
75	0.55	99.7	(Concentración de amonio)	7.4·10 ⁻⁵	0.01	--

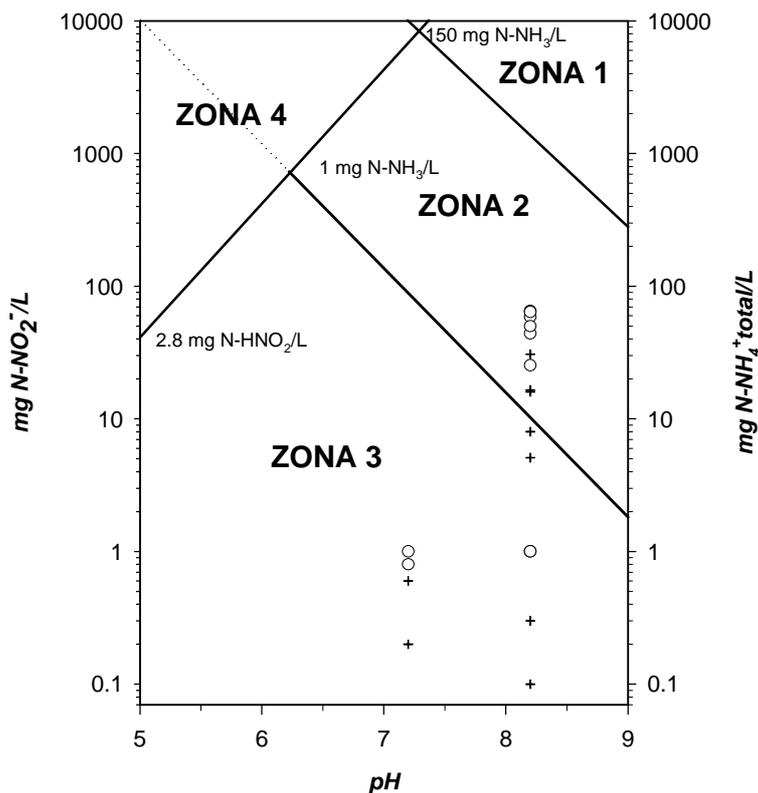


Figura 4.227.- Diagrama de Anthonisen a una temperatura de 30 °C. Zona 1: inhibición de Nitrobacter y Nitrosomonas por amoníaco libre. Zona 2: inhibición de Nitrobacter por amoníaco libre. Zona 3: nitrificación completa. Zona 4: inhibición de Nitrobacter por ácido nitroso. Los puntos de los experimentos de la tabla 4.217. se representan en el diagrama: o concentración de amoníaco y + concentración de nitrito.

Examinando la tabla 4.217., se observa que la concentración de ácido nitroso en ningún momento es suficiente como para producir inhibición, según Anthonisen *et al.* (1976). Por otra parte, en el caso del amoníaco libre, en varios experimentos la concentración alcanzada provoca que exista inhibición de *Nitrobacter winogradskyi*.

En los casos en que limita el aporte de oxígeno, esta limitación se suma al efecto de la inhibición debido a la acumulación de amonio, que provoca que la oxidación de nitrito a nitrato por parte de *Nitrobacter winogradskyi* esté limitada por la concentración de oxígeno disuelto e inhibida por la elevada concentración de amoníaco libre.

Según otros autores (Hunik *et al.*, 1992), elevadas concentraciones de nitrito también pueden resultar inhibitorias para *Nitrosomonas europaea*. Aunque el efecto de la forma tóxica (HNO₂) aumenta a valores de pH bajos (debido a que aumenta su concentración), incluso a pH = 8.5 estos autores sostienen que existe inhibición por producto de la especie *Nitrosomonas europaea*. No obstante, las concentraciones máximas de nitrito alcanzadas durante los experimentos están alejadas todavía de valores que puedan resultar inhibitorios.

Balance de nitrógeno

El balance de nitrógeno en el reactor se puede plantear con la siguiente ecuación (suponiendo que no existe desnitrificación ni pérdidas de amonio por la corriente de gas):

$$(r_{\text{NH}_4^+})_{\text{entrada}} = (r_{\text{NH}_4^+})_{\text{salida}} + (r_{\text{NO}_2^-})_{\text{salida}} + (r_{\text{NO}_3^-})_{\text{salida}} + r_X \quad (4.259.)$$

Donde $(r_i)_j$ son los g N-especie i (i = amonio, nitrito, nitrato) por unidad de volumen y de tiempo en j (entrada o salida), y r_X es la velocidad de formación de biomasa:

$$r_X = [X]_{\text{libre}} \cdot \frac{q_{\text{líquido}}}{V_{\text{reactor}}} + \frac{d[X]_{\text{libre}}}{dt} + \frac{d[X]_{\text{biopelícula}}}{dt} \quad (4.260.)$$

Donde $[X]_{\text{libre}}$ se refiere a la concentración de células en suspensión, $q_{\text{líquido}}$ es el caudal de líquido del continuo, los términos $\frac{d[X]_i}{dt}$ representan la acumulación de células en suspensión ($i = \text{libre}$) y la acumulación de células en la biopelícula, y V_{reactor} se refiere al volumen de líquido de todo el reactor. La concentración de células está expresada como g N-biomasa/L.

Debido a que aproximadamente sólo el 2 % del nitrógeno consumido por las células se destina a crecimiento celular (Kowalski y Lewandowski, 1983), el término r_X del **balance 4.259.** no puede ser estimado con precisión por diferencia a partir de las muestras analizadas debido a la precisión en el análisis de amonio, nitrito y nitrato, que es en la mayoría de los casos del mismo orden.

La precisión de los análisis de amonio, nitrito y nitrato depende de la concentración de las interferencias y de la dilución realizada. Se realizó un pequeño estudio sobre la variabilidad de los resultados de los análisis, poniéndose de manifiesto que el análisis de nitrato era el que sufría una variación mayor, por tanto, el más impreciso. Por otra parte, la mayoría de interferencias posibles descritas en el método correspondiente no afectan a ninguno de los análisis ya que el medio utilizado es muy simple (véase capítulo *Materiales y Métodos*). No obstante, una de las interferencias que afectan al resultado del análisis de nitrato (análisis colorimétrico químico comercial, descrito en el capítulo *Materiales y Métodos*), es la concentración de nitrito, factor que influye directamente en muchos de los experimentos. En estos casos se llega a un compromiso entre la dilución efectuada (que también disminuye la concentración de interferencia) y el efecto de la concentración de nitrito en el análisis de nitrato. La precisión del análisis de nitrato afecta, por supuesto, a la precisión de la suma de los compuestos nitrogenados analizados (denominado nitrógeno total en las gráficas presentadas en las figuras 4.218., 4.220, 4.221. y 4.222.).

El valor de r_X puede determinarse a partir de la expresión:

$$r_X (\%) = \frac{\left(\frac{g N}{L \cdot h} \right)_{\text{en la entrada } (NH_4^+)} - \left(\frac{g N}{L \cdot h} \right)_{\text{en la salida } (NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-)}}{\left(\frac{g N}{L \cdot h} \right)_{\text{en la entrada } (NH_4^+)}} \cdot 100 \quad (4.261.)$$

En la **figura 4.228.** se representa el valor de r_X según la **ecuación 4.261.**, a lo largo del tiempo de operación de uno de los reactores utilizados. Como se puede observar en esta gráfica, el error asociado a cada uno de los análisis (amonio, nitrito y nitrato), impide la evaluación de este término a partir del balance. Aunque resulte poco significativo dada la elevada dispersión de los resultados (desviación estándar = 4.1), la media aritmética de todos los valores representados es de 1.95 %, muy cercano al 2 % bibliográfico.

Estos resultados demuestran que no se ha producido desnitrificación significativa durante los experimentos. La desnitrificación no se puede descartar *a priori*, ya que los estratos internos de la biopelícula se pueden encontrar en condiciones de anaerobiosis.

4.2.2.4.- Análisis de una columna una vez parada la operación

Uno de los impedimentos encontrados en el estudio de la nitrificación axénica en estos reactores, ha sido la falta de una instrumentación adecuada para la medida de concentración de células inmovilizadas. Por una parte, en este tipo de sistemas, la manipulación está realmente restringida debido a que se deben mantener condiciones de axenicidad. Por otra parte, aunque se consiguiese esquivar dichas restricciones, las manipulaciones del soporte en un reactor de lecho fijo de este tipo, afectarían seriamente a la biopelícula si ésta estuviese ya desarrollada. Esto es debido al hecho que la biopelícula que inicialmente se halla únicamente rodeando a la partícula, rápidamente se extiende,

uniéndose a las células de las biopelículas contiguas, por lo que la manipulación terminaría siendo un método destructivo o invasivo, alterando la estructura de la biopelícula. Por tanto, por estos motivos se descarta cualquier forma de seguimiento que implique toma de muestras del lecho y análisis posterior.

En este tipo de sistemas sería de gran interés disponer de medidas en línea de la concentración de células inmovilizadas, que tuvieran carácter no invasivo, es decir, que no distorsionaran la estructura del lecho empacado y permitieran seguir la evolución de células en su interior. La monitorización de biopelículas todavía es un problema sin resolver (Flemming, 1999), el objetivo de las investigaciones está dirigido a conseguir información en tiempo real, de forma no destructiva e *in situ*. Los métodos para detectar y cuantificar biopelículas (y general depósitos o incrustaciones de naturaleza no biológica) se basan en parámetros como la pérdida de carga, reflexión de la luz, resistencia a la transferencia de calor, resistencia al rozamiento, propiedades electroquímicas o incremento de peso. Incluso se están desarrollando métodos como la Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), para obtener información detallada de la naturaleza de la película. También dentro del proyecto MELISSA se está empezando a desarrollar un prototipo basado en medidas de impedancia eléctrica multifrecuencia (Pastor, 2000).

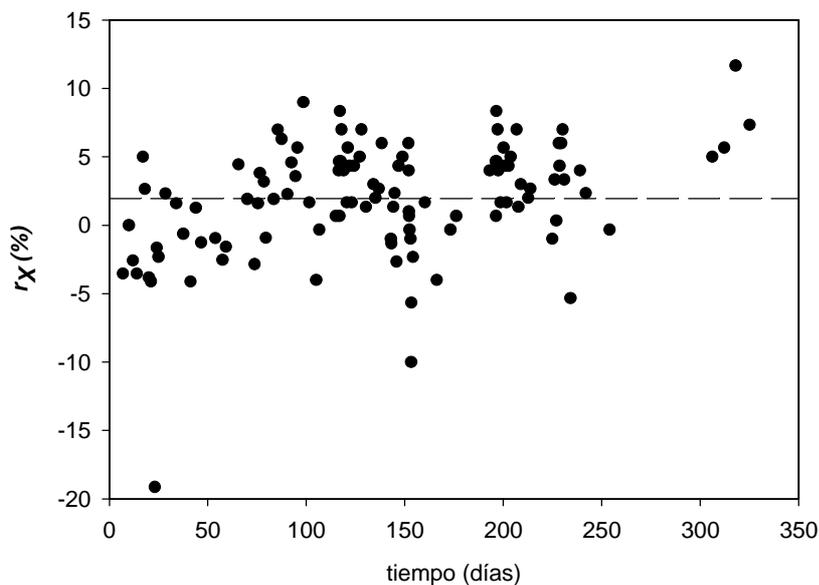


Figura 4.228.- Representación gráfica del valor en porcentaje de la velocidad de crecimiento de biomasa, expresada en g N-biomasa por unidad de volumen y unidad de tiempo (r_X) para cada una de las muestras analizadas en uno de los reactores utilizados. El valor medio se representa mediante la línea discontinua (— — —).

Estimación de la concentración de biopelícula

Una vez parada la operación de los reactores era el momento en el que resultaba posible la estimación de la concentración celular en el lecho. La biopelícula se separó del soporte mediante lavados sucesivos con medio de cultivo sobre un equipo de vacío, que disponía de una membrana de silicona con orificios de unos 2 mm, que impedían el paso de las partículas de soporte. Una vez la biopelícula se había separado del soporte, el volumen obtenido de biomasa en suspensión se centrifugó (10^4 r.p.m. durante 20 minutos) y se resuspendió en una solución tampón de fosfato (0.4 M NaCl, 50 mM de tampón fosfato al pH del medio de cultivo y 50 mM de $MgSO_4$), ciclo que se repitió tres veces, para minimizar el contenido en sales. Por último, después de la última etapa de centrifugación, se añadió agua destilada para resuspender el sólido y se procedió a la liofilización. A partir de este liofilizado se determinó el peso seco de biomasa en el lecho (en el momento en el que se detuvo la operación). El peso seco obtenido de biomasa (biopelícula) es de 13.2 g.

A partir de este valor de peso seco de biopelícula, es posible determinar la concentración de biomasa por unidad de volumen de reactor:

$$[X]_{biopelícula} = \frac{\text{peso seco de biomasa}}{\text{volumen de reactor}} = \frac{13.2 \text{ g}}{0.650 \text{ L}} = 20.3 \text{ g/L} \quad (4.262.)$$

Esta concentración de biomasa obtenida es ligeramente superior a las referencias presentadas por Martins dos Santos *et al.* (1998), en las que asigna un rango de concentración de biomasa para filtros flotantes de entre 5 y 15 g/L. Este valor relativamente elevado de concentración de biomasa en el reactor está relacionado con el tipo de operación a la que ha estado sometido el reactor. En esta columna se han llevado a cabo los experimentos descritos para determinar la carga máxima del reactor, con lo que durante periodos importantes de tiempo se ha mantenido a la columna operando bajo condiciones en las que no había conversión completa, lo cual estimula el desarrollo de la biopelícula. Este desarrollo está limitado por el área específica disponible del reactor, lo que ha supuesto grosores de biopelícula superiores a los habituales, como se describe en el siguiente apartado.

Estimación del espesor de biopelícula

A partir del valor de peso seco obtenido de biopelícula, es posible estimar su espesor promedio, considerando que éste es homogéneo, y que la densidad aproximada de biopelícula es de 200 kg biomasa seca / m^3 de volumen húmedo (Characklis y Marshall, 1990). Para calcular el grosor de biopelícula se parte de las siguientes ecuaciones (véase **figura 4.229.**, en la que se esquematiza una partícula de soporte rodeada de biopelícula):

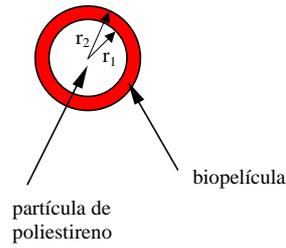


Figura 4.229.

$$V_{biopelícula} = 13.2 \text{ g} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{0.2 \text{ g biomasa seca}} = 0.066 \text{ L}$$

$$V_{total} = V_{soporte} + V_{biopelícula} = 0.204 \text{ L}$$

$$V_{soporte} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_1^3 \cdot N_p = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{0.41}{2}\right)^3 \cdot N_p \Rightarrow N_p = 3824$$

$$\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_2^3 \cdot N_p = V_{total} \Rightarrow r_2 = \sqrt[3]{\frac{V_{total}}{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot N_p}} = 0.234 \text{ cm}$$

$$r_2 = r_1 + \text{espesor de biopelícula} = \frac{0.41 \text{ cm}}{2} + \text{espesor de biopelícula}$$

$$\text{Espesor de biopelícula} = 0.29 \text{ mm}$$

Este grosor de biopelícula es relativamente elevado si se compara con valores en reactores tipo *gas-lift*, que no superan los 0.16 mm de espesor (Garrido, 1996), aunque Characklis y Marshall (1990), citan espesores de biopelícula de entre 0.15 – 0.58 mm, para bacterias nitrificantes.

La estimación del grosor de biopelícula considera que éste es homogéneo alrededor de las partículas, pero en realidad, las bacterias se acumulan en los espacios libres que deja el empacamiento de las partículas en el lecho (véase **figura 4.231.**).

Un espesor elevado de biopelícula dificulta el aporte de sustratos (y oxígeno) a las células que ocupen estratos más internos, con la consiguiente aparición de muerte celular. La muerte celular de los estratos más cercanos al soporte está asociada a desprendimiento de fragmentos de biopelícula, parcialmente eliminados del reactor por el efluente. Durante las observaciones microscópicas realizadas periódicamente de las muestras líquidas extraídas de la cabecera del reactor, se detectaron estos fragmentos, sobre todo durante la última parte del periodo de operación, en la cual la eliminación de la carga de entrada no era total (**figura 4.230.**).

Por otra parte, otro aspecto importante que se desprende de estimación de la concentración de biomasa y del grosor de biopelícula, es que la biopelícula no sólo contendrá células activas, sino que existirán células no activas, dificultando la medida en línea de concentración de células inmovilizadas, puesto que este valor debería ser tratado para conocer el porcentaje de células viables en la biopelícula.

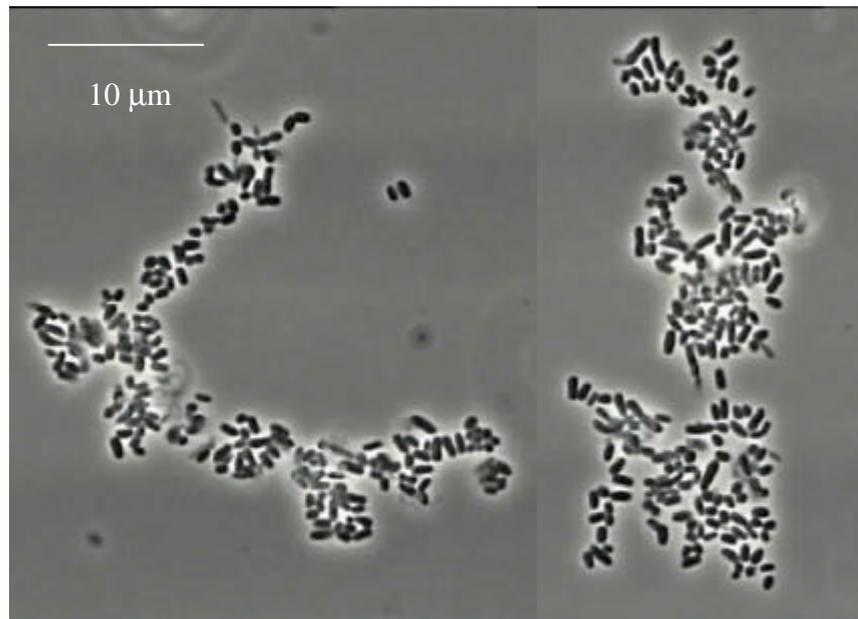


Figura 4.230.- Fotografías realizadas mediante microscopio óptico (1000 aumentos, contraste de fases) de fragmentos de biopelícula desprendidos en suspensión en el medio líquido del reactor.

Variación de la porosidad del lecho a lo largo del periodo de operación

La fracción libre de lecho o porosidad de lecho ($1 - \varepsilon_p$) no es constante durante el tiempo de operación, ya que el desarrollo de la biopelícula provoca que disminuya el volumen relativo de las fases líquida y gas en el lecho. Este hecho afecta directamente al volumen de líquido en el reactor, y por otra parte, a la velocidad superficial del gas en el lecho. Al no poderse cuantificar en línea el grosor de biopelícula, resulta imposible conocer en tiempo real la variación de la porosidad del lecho, a no ser que esta variación se calcule a partir de modelos que permitan estimar la acumulación de células en la biopelícula. La porosidad calculada teniendo en cuenta el volumen de biopelícula, y la desviación que representa respecto a la porosidad inicial se muestran en la **tabla 4.218**.

Otra variable que puede afectar a la porosidad del lecho es la deformación del soporte, y en menor medida la compactación de la biopelícula puede provocar también cambios en el espesor, y por tanto afectar también a la porosidad. Inicialmente el lecho sufre una reorganización habitual de las partículas después de la carga del reactor, que debido al flujo tanto de líquido como de gas provoca que el lecho disminuya su fracción de volumen libre. Por otra parte, la compactación del soporte se hace evidente si el reactor opera durante periodos de tiempo prolongados (tabla 4.218.), esto no sólo puede hacer variar la fracción vacía del lecho, sino que disminuye la altura del mismo (véase **figura 4.232**).

Tabla 4.218.- Variación de la fracción de sólidos (soporte y biopelícula) durante la operación de los reactores a escala laboratorio. La fracción inicial de sólidos es 0.45 (apartado 4.2.1.1.)

Tiempo de operación	2-3 semanas	6 meses	1.5 años
Variación de la altura de lecho (cm)	-1.5	-4.5	-7
Fracción de sólidos (incluyendo la biopelícula)	0.48	0.74*	0.77*

Reorganización inicial de las partículas del lecho después de la carga del soporte

Deformación del soporte + desarrollo de la biopelícula

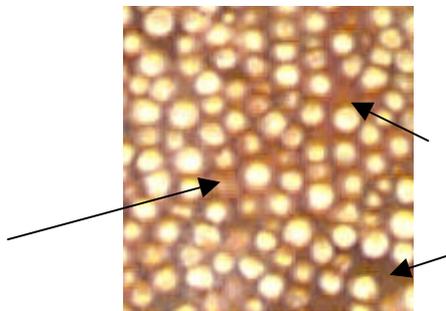


Figura 4.231.- Detalle del empaqueo de las partículas. La biopelícula se desarrolla aprovechando los espacios libres (marcado con flechas).

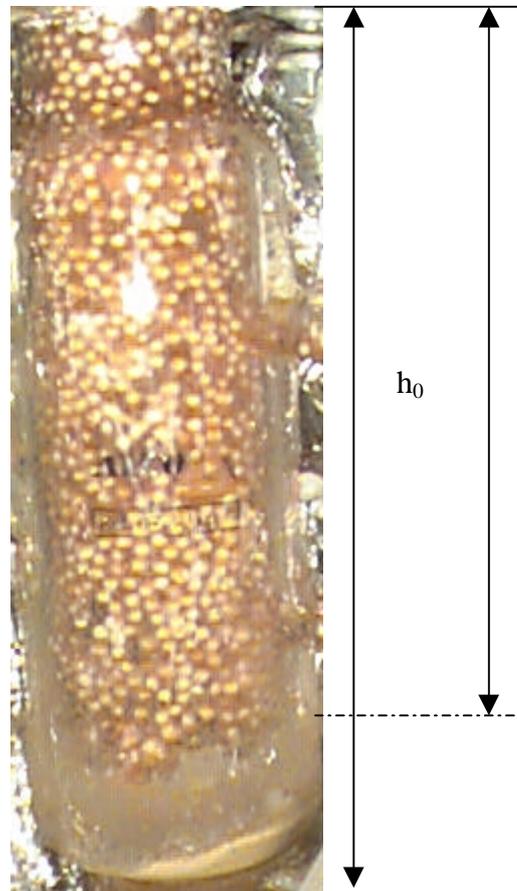


Figura 4.232.- Aspecto del lecho de uno de los reactores a escala laboratorio después de un tiempo de operación de un año y medio. Se puede apreciar la diferencia en la altura de lecho, debido a la compactación del soporte (h_0 : altura inicial, h_f : altura final).

* Para realizar los cálculos se ha considerado que el volumen de biopelícula es constante a partir de 6 meses, y por otra parte, que la fracción de soporte se mantenía constante, asignando la variación de altura del lecho a la variación de volumen de soporte.

Eliminación forzada de biopelícula en los reactores: control de la biopelícula

Debido a los problemas que se derivan del excesivo desarrollo de la biopelícula durante la operación con este tipo de reactores, y para evitar la completa colmatación del lecho, se diseñó un circuito de eliminación forzada de biopelícula del lecho. El funcionamiento de este circuito se basa en la facilidad que presentan los filtros flotantes para la realización de operaciones de limpieza (eliminación de biomasa) en contracorriente (Le Tallec *et al.*, 1997, Lazarova *et al.*, 1994; Meaney y Strickland, 1994). Así se añadió un circuito de recirculación al ya existente (utilizado en la operación normal de la fase líquida), que permite la circulación de líquido por el lecho en flujo descendente.

De esta manera, el exceso de biopelícula es arrastrado a la cabecera del reactor, de donde se eliminará debido al flujo continuo que se pondrá de nuevo en marcha, con posterioridad a la maniobra de limpieza (**figura 4.233.**). Una vez en el reactor se ha alcanzado un desarrollo importante de la biopelícula estos ciclos deben iniciarse y repetirse con una frecuencia que vendrá determinada por el tipo de carga que se aplique al reactor.

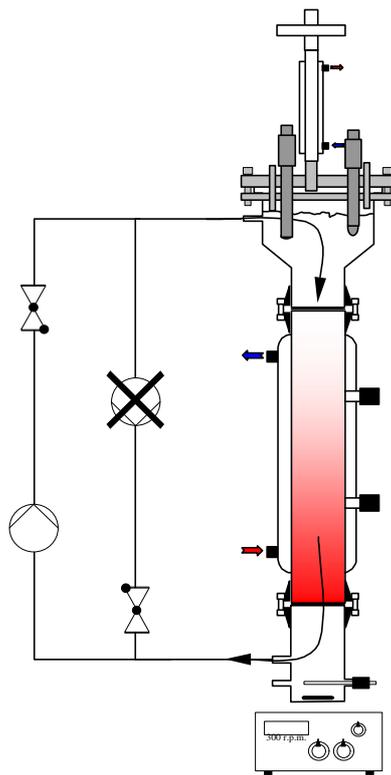


Figura 4.233.- Circuito de limpieza en contracorriente.

Para aplicar la operación de eliminación forzada de biopelícula, es necesario detener la operación normal del reactor. Se interrumpe la recirculación habitual (en flujo ascendente a través del lecho), así como la entrada y salida de medio y también la aeración. La salida de gas se cierra completamente y se invierte el flujo normal de líquido del reactor, pasando éste a ser descendente. El caudal es de unas 10-15 veces superior al habitual de recirculación, con lo que se consigue que parte de la biopelícula existente se desprenda y pase a quedar en suspensión. Una vez finalizado este proceso, la operación en continuo del reactor permite eliminar los fragmentos de biopelícula a través de la conducción de salida.

Después de cada uno de estos ciclos de duración aproximada una hora, se vuelve progresivamente a la operación normal del reactor.

Observaciones microscópicas

Una vez se concluyó la operación de los reactores se recogieron muestras de la biopelícula adherida al soporte, y sin separarla de éste se prepararon muestras para ser observadas mediante técnicas de microscopía laser confocal (Confocal Laser Scanning). Las muestras se prepararon mediante fijación y tinción: inmersión en glutaraldehído en tampón cacodilato durante una hora, inmersión en formaldehído (fijador) durante media hora, cinco minutos en PBS (390 mM NaCl, 10mM tampón fosfato, pH=7.2) y tinción mediante una solución de naranja de acridina en ácido acético (durante diez minutos).

Los resultados de estas observaciones se muestran en la **figura 4.234**. En estas fotografías se puede apreciar tanto la biopelícula como el soporte. La superficie del soporte se observa integrada de “microesferas” que aumentan la superficie específica y la microrrugosidad del soporte, hecho que facilita la colonización de las primeras células (véase también **figura 4.235**).

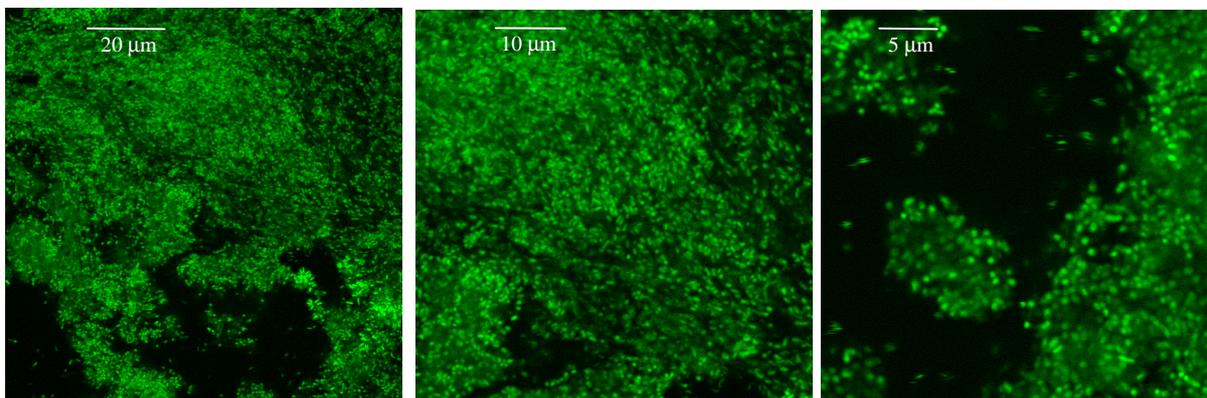


Figura 4.234a.- Biopelícula separada del soporte. Fotografías obtenidas mediante microscopía laser confocal (objetivo de 100 aumentos sin zoom, con zoom de 1.8 y 2.8 respectivamente).

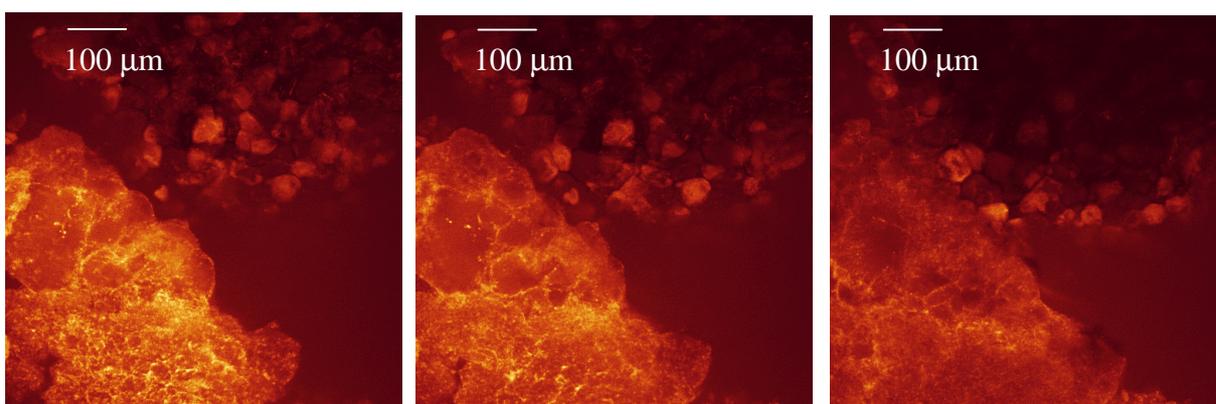


Figura 4.234b.- Fotografías obtenidas con mediante microscopía laser confocal. Objetivo utilizado de 16 aumentos. Cada una de las fotografías está realizada con una diferencia de enfoque de 15.4 micras. En la parte alta de cada una de las fotografías se aprecia la estructura microscópica de las partículas de poliestireno, integradas por esferas minúsculas que aumentan la microrrugosidad del soporte. En la mitad inferior izquierda se halla la biopelícula, adherida al soporte.

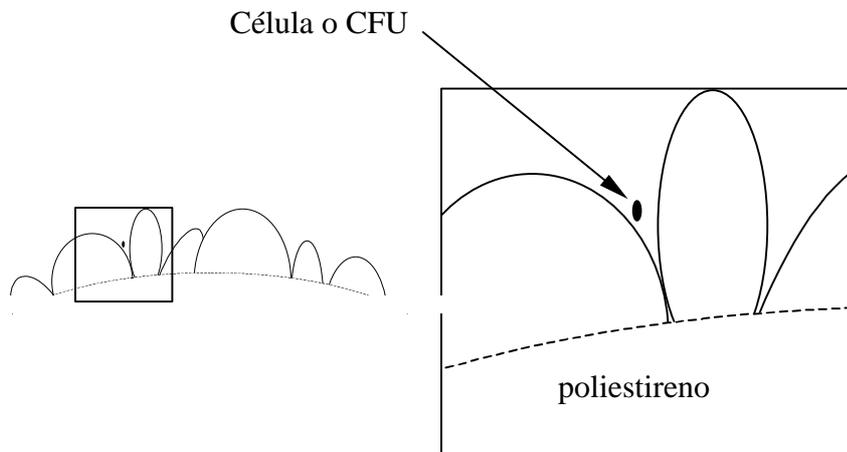


Figura 4.235.- Representación esquemática del perfil de la superficie de una de las cuentas de poliestireno. Las "microesferas" que integran el material favorecen la colonización de las primeras bacterias, ya que protegen a la célula de los efectos de la turbulencia y las fuerzas de cizalla.

4.3.- El reactor piloto

El reactor piloto (descrito en el capítulo *Materiales y Métodos*) dispone de una mayor instrumentación que en el caso de los reactores a escala laboratorio. Esto permite conseguir tanto un control más eficiente como la obtención de una información más detallada de las variables que influyen en el proceso de nitrificación. Por otra parte, la diferencia considerable de volumen entre este reactor y las columnas a escala laboratorio influye en otros aspectos: la esterilización del reactor se debe hacer *in situ*, es posible mantener una geometría en que el diámetro es constante en todas las secciones del reactor y por último, esta mayor capacidad permite la conexión física de este reactor con el resto de compartimentos de la planta piloto.

4.3.1.- Caracterización física

4.3.1.1.- Determinación de volúmenes de sólido, líquido y gas

El primer paso para determinar el volumen ocupado por las diferentes fases en el reactor, es considerar las condiciones de operación que afectarán a estos y definirlos. En el reactor piloto el caudal de aeración se mantiene constante (3 L/min), con lo cual, la determinación de los volúmenes de cada una de las fases no se ve afectada por esta variable. Es posible mantener constante el caudal de aeración ya que el control del oxígeno disuelto se realiza a partir del enriquecimiento de la fase gas con oxígeno puro mediante caudalímetros máxicos independientes para el oxígeno, el nitrógeno y el dióxido de carbono (véase capítulo *Materiales y Métodos*). El efecto del tiempo de operación sobre el volumen de la fase sólida (ya sea debido al desarrollo de la biopelícula o a la compactación del soporte), se analiza más adelante, en el apartado 4.3.2.4.

Procedimiento experimental

El método experimental utilizado para determinar el volumen de cada una de las fases es el denominado técnica de expansión del volumen, como ya se ha descrito y justificado en el apartado 4.2.1.1. para el caso de los reactores a escala laboratorio.

El volumen total de reactor determinado experimentalmente es de 8.1 L, mientras que los cálculos teóricos del volumen de cada una de las partes a partir de las dimensiones del reactor se presentan en la **tabla 4.301**.

Resultados de la determinación de los volúmenes ocupados por cada una de las fases

En la determinación del volumen de sólido únicamente se determinó el volumen ocupado por el soporte, ya que el volumen ocupado por la biopelícula se estima en el apartado 4.3.2.4. con posterioridad a la interrupción de la operación del reactor.

Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla 4.302**. La retención de gas en el reactor se presenta en la **tabla 4.303**.

Tabla 4.301.- Dimensiones del reactor piloto y volúmenes teóricos de cada una de las secciones.

	Diámetro (mm)	Altura (mm)	Volumen total (L)
Parte inferior	112	150	1.48
Parte central	112	18	0.18
	120	475	5.37
	112	63	0.62
Parte superior	112	50	0.49
TOTAL			8.14

Tabla 4.302.- Determinación de los volúmenes de sólido, líquido y gas en el reactor piloto (caudal de aeración de 3 L/min).

Volumen de sólido (L)	Volumen de gas (L)	Volumen de líquido (L)
3.9	0.4	3.8

Tabla 4.303.- Volumen experimental de la fase gas y de la fase líquida. 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 ⁻¹)	Volumen de gas (L)	Volumen de líquido (L)	Retención de gas (%)
3000	0.7	0.4	3.8	10

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 totales teóricos de cada una de las partes:

$$e_p = \frac{\text{Volumen de sólido}}{\text{Volumen total de lecho}} = \frac{3900}{6170} = 0.63 \quad (4.301.)$$

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:

$$a = \frac{\text{Volumen de sólido}}{\text{Volumen total de lecho}} \cdot \frac{\text{Superficie de partícula}}{\text{Volumen de partícula}} = e_p \cdot \frac{p \cdot d_p^2}{\frac{p}{6} \cdot d_p^3} = e_p \cdot \frac{6}{d_p} = \quad (4.302)$$

$$= 0.63 \cdot \frac{6}{4.1 \cdot 10^{-3}} = 925 \text{ m}^2/\text{m}^3$$

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):

$$A = \frac{\text{Volumen de sólido}}{\text{Volumen total de reactor}} \cdot \frac{\text{Superficie de partícula}}{\text{Volumen de partícula}} = \frac{3.9}{8.1} \cdot \frac{6}{d_p} = 705 \text{ m}^2/\text{m}^3 \quad (4.303)$$

4.3.1.2.- 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*, y al igual que en el caso de las columnas a escala laboratorio, 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 uno de los experimentos se presentan en la **tabla 4.304**.

Los resultados de los experimentos de distribución del tiempo de residencia se presentan en la **figura 4.301**. Se ha elegido una representación adimensional que permite realizar comparaciones entre experimentos fácilmente. Para ello se han adimensionalizado tiempo y concentración de trazador tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.1.2. para los reactores a escala laboratorio.

Tabla 4.304.- Condiciones de operación del reactor durante los diferentes experimentos de distribución del tiempo de residencia.

Nº de experimento	Caudal de gas (L/min)	Caudal de líquido (mL/min)	Agitación (r.p.m.)	Caudal de recirculación (mL/min)	Relación de recirculación (rec./entrada)
1	3	2.8	400	45	15/1
2	3	2.8	400	18	6/1
3	3	2.8	400	0	--
4	0	2.8	400	0	--

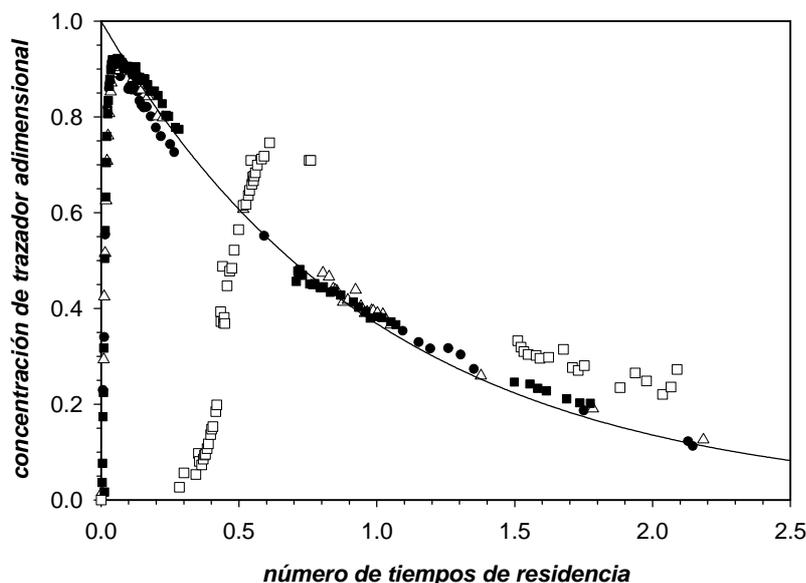


Figura 4.301.- Experimentos de distribución del tiempo de residencia. ● experimento 1 (relación de recirculación de 1/15), ▲ experimento 2 (relación de recirculación de 1/6), ■ experimento 3 (con aeración pero sin recirculación), □ experimento 4 (sin aeración y sin recirculación). La línea continua representa el comportamiento ideal de un tanque perfectamente agitado.

Examinando la figura 4.301., se observa que la aeración (caudal de 3 L/min) favorece la mezcla en el reactor de forma muy importante. De hecho, incluso sin recirculación externa, la mezcla de la fase líquida del reactor piloto sufre una desviación mínima respecto al comportamiento de un tanque perfectamente agitado. Al contrario que en los reactores a escala laboratorio, no se detecta ningún indicio que conduzca a pensar en la existencia de un volumen muerto.

Esta diferencia de comportamiento entre el reactor piloto y los reactores a escala laboratorio se debe principalmente a la diferente geometría de la sección superior: en el caso del reactor piloto la sección superior mantiene el diámetro del resto de secciones, y además, el porcentaje del volumen total es mucho menor (18 % respecto al volumen total del reactor), por lo que el caudal de aeración provoca una mezcla suficiente como para que no existan desviaciones importantes del comportamiento de un tanque perfectamente agitado. Mientras que en los reactores a escala laboratorio el diámetro de la sección superior es mucho mayor (para conseguir albergar sondas y conexiones), y además el volumen de la sección superior respecto al total del reactor es mucho mayor (36 %), hecho que impide que la aeración consiga mezclar de forma ideal esta sección.

La distribución del tiempo de residencia de la fase líquida en reactores de lecho fijo con tres fases ha sido ampliamente estudiada en el campo de la Ingeniería Química. Los estudios realizados demuestran que la dispersión axial (retromezcla) es importante, sobre todo en el caso de reactores con flujo ascendente (Carberry y Varma 1986). De hecho existen correlaciones que relacionan el módulo de Peclet (Pe_L basado en el diámetro de

partícula) con el módulo de Reynolds para el líquido (Re_L) en reactores de este tipo (Cassanello *et al.*, 1992):

$$Pe_L = \frac{u_L \cdot d_p}{D_z} = 0.05 \cdot Re_L^{0.53} \cdot Re_G^{-0.134} \quad (4.304)$$

Donde el módulo de Re de la fase K se puede calcular a partir de la expresión:

$$Re_K = \frac{u_K \cdot d_p \cdot \rho_K}{\mu_K \cdot \varepsilon}; \quad \text{con } u_K = \frac{q_K}{S} \quad (4.305)$$

Donde ρ_K y μ_K son la densidad y la viscosidad de la fase K respectivamente, u_K la velocidad superficial de la fase K, que se calcula a partir del caudal de la fase (q_K) que atraviesa el lecho y de la superficie transversal al flujo (S), que se corrige mediante la porosidad del lecho (ε , fracción libre del lecho). D_z simboliza el coeficiente de dispersión axial.

Como se puede observar, el valor del módulo de Peclet aumenta al disminuir el módulo de Reynolds de la fase líquida. Mientras que disminuye cuando se aumenta el módulo de Reynolds de la fase gas. Es decir, un aumento del caudal de la fase gas aumenta la dispersión axial (disminuye el módulo de Peclet), mientras que un aumento en el caudal de líquido provoca un aumento en el módulo de Peclet, y por tanto, una menor retromezcla en el lecho.

Si se evalúan los módulos de Reynolds de las fases líquida y gas para las condiciones en que se realizaron los experimentos de tiempo de residencia se obtiene:

$$Re_G = 3.3; \quad Re_L = [8 \cdot 10^{-3} - 0.1], \text{ dependiendo del caudal de recirculación utilizado.}$$

Si se estima con estos valores el valor del módulo de Peclet se obtiene una variación de $1/Pe = [200-50]$, por lo que de este análisis se desprende que el comportamiento previsible de la mezcla de la fase líquida en el reactor es realmente cercano al de un tanque agitado, incluso antes de realizar los experimentos de distribución del tiempo de residencia.

Esto se debe principalmente a que el caudal de líquido empleado es bajo, obteniéndose valores del módulo de Reynolds muy bajos. Esto permite que la fase gas con un caudal mucho más elevado (3 L/min de gas frente a 0.003-0.048 L/min de líquido), provoque una mezcla elevada de la fase líquida.

Por tanto, la fase líquida del reactor piloto tiene un comportamiento muy cercano al de un tanque perfectamente agitado, debido principalmente al elevado caudal de aeración, y al reducido caudal de líquido.

4.3.1.3.-Modelo de flujo

Consideraciones iniciales

En el caso del reactor piloto se ha utilizado un modelo totalmente paralelo al descrito para los reactores a escala laboratorio, exceptuando el volumen muerto que se asignó en estos reactores a la sección superior, que para el reactor piloto ya se ha descartado (véase la discusión del apartado anterior). Una representación esquemática del modelo de flujo se presenta en la **figura 4.302**. Al igual que para los reactores a escala laboratorio, 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. Y se introduce un parámetro que será estimado a partir de optimización numérica: el caudal de retromezcla (coeficiente f de retromezcla), que sigue asociado al efecto de la aeración sobre la mezcla de la fase líquida.

Los balances de materia para el trazador, en las condiciones de los experimentos, se plantean en las **ecuaciones 4.306. - 4.308.**; a continuación se definen las constantes y las condiciones iniciales del sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{1}{V_A} [q_r \cdot C_C + f \cdot (q + q_r) \cdot C_B - (1 + f)(q + q_r) \cdot C_A] \quad (4.306.)$$

$$\frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{V_B} [(1 + f)(q + q_r) \cdot C_A + f \cdot (q + q_r) \cdot C_C - (1 + 2 \cdot f)(q + q_r) \cdot C_B] \quad (4.307.)$$

$$\frac{dC_C}{dt} = \frac{1}{V_C} [(1 + f)(q + q_r) \cdot C_B - (1 + f)(q + q_r) \cdot C_C] \quad (4.308.)$$

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 una de estos tanques, q y q_r son los caudales de entrada y recirculación respectivamente, f es el coeficiente de retromezcla (parámetro ajustable del modelo).

Valores de las variables conocidas:

$$V_A = 1.398 \text{ L}$$

$$V_B = 1.976 \text{ L}$$

$$V_C = 0.466 \text{ L}$$

$$q = 2.8 \cdot 10^{-3} \text{ L/min}$$

$$q_r = [0, 18, 45] \cdot 10^{-3} \text{ L/min (dependiendo del experimento)}$$

Condiciones iniciales de las ecuaciones 4.304., 4.305. y 4.306.: $C_A = M/V_A$; $C_B = C_C = 0$, a tiempo $t = 0$. Donde M es la masa de trazador introducida en el pulso.

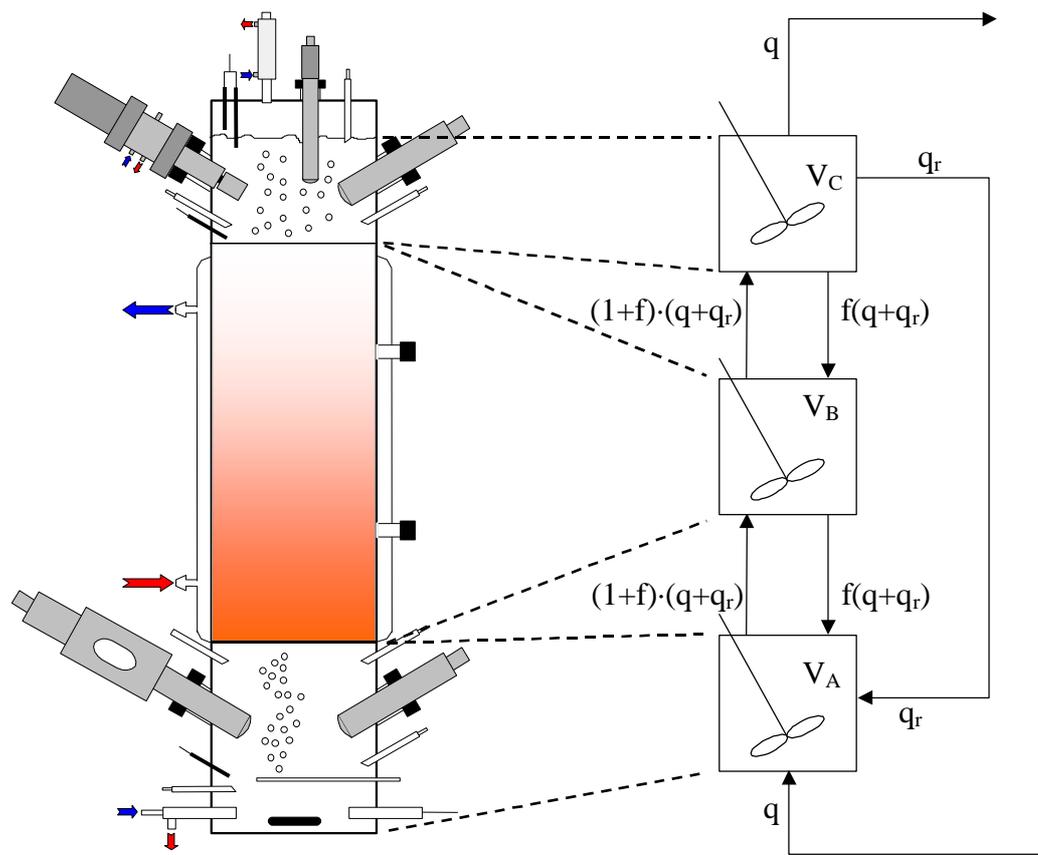


Figura 4.302.- Esquema del modelo de flujo propuesto para la fase líquida del reactor piloto. Donde: q es caudal de entrada al reactor, q_r el caudal de recirculación externa, V_i el volumen de cada una de las partes (siendo A: sección inferior, B: lecho y C: sección superior), f el coeficiente de retromezcla y $f(q+q_r)$ el caudal de retromezcla entre tanques.

A partir del modelo propuesto, al igual que en el caso de los reactores a escala laboratorio la expresión general de la función objetivo (**ecuación 4.309.**) permite determinar mediante optimización univariable el coeficiente de retromezcla (parámetro del modelo).

$$f_{\text{objetivo}} = \sum_{i=1}^n (y_i^{\text{teórica}} - y_i^{\text{experimental}})^2 \quad (4.309.)$$

Con n el número de puntos del experimento; $y_i^{\text{teórica}}$ es la concentración teórica del tanque C en el instante t hallada al resolver el anterior sistema de ecuaciones diferenciales, e $y_i^{\text{experimental}}$ es 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 obtienen 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*).

Las restricciones aplicadas en la optimización, son para evitar que el parámetro (coeficiente de retromezcla, f) sea negativo:

$$f \geq 0 \quad (4.310.)$$

Todos los cálculos se realizaron mediante MATLAB (v. 4.2b, The MathWorks, Inc. 1994). Se utilizaron como funciones de optimización: *constr*, *fmin*, y como funciones de resolución de ecuaciones diferenciales: *ode45* (modificada).

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

$$\text{norma} = \sqrt{f_{\text{objetivo}}(f_{\text{opt}})} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{teórica}} - y_i^{\text{experimental}})^2} (f_{\text{opt}}) \quad (4.311.)$$

Donde $f_{\text{objetivo}}(f_{\text{opt}})$ es el valor de la función objetivo evaluada utilizando el parámetro f resultante de la optimización.

La precisión del parámetro obtenido después de la optimización se determina mediante el método propuesto por Draper *et al.* (1998, véase la descripción realizada en el apartado 4.2.1.3.).

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

Experimento 1

(Caudal de recirculación, q_r : 45 mL/min; caudal de aeración: 3 L/min; q : 2.8 mL/min; masa de trazador: 0.57 g)

En la **figura 4.303**. se presenta el ajuste realizado. Como resultado de la optimización numérica se obtuvo el siguiente valor de parámetro:

Coefficiente de retromezcla: 0.219 (caudal de retromezcla = 10.5 mL/min)

Estimación de la precisión del parámetro:

Nivel de confianza 95 % $0.16 \leq f \leq 0.28$

Nivel de confianza 99 % $0.15 \leq f \leq 0.30$

Bondad del ajuste (norma): 0.018

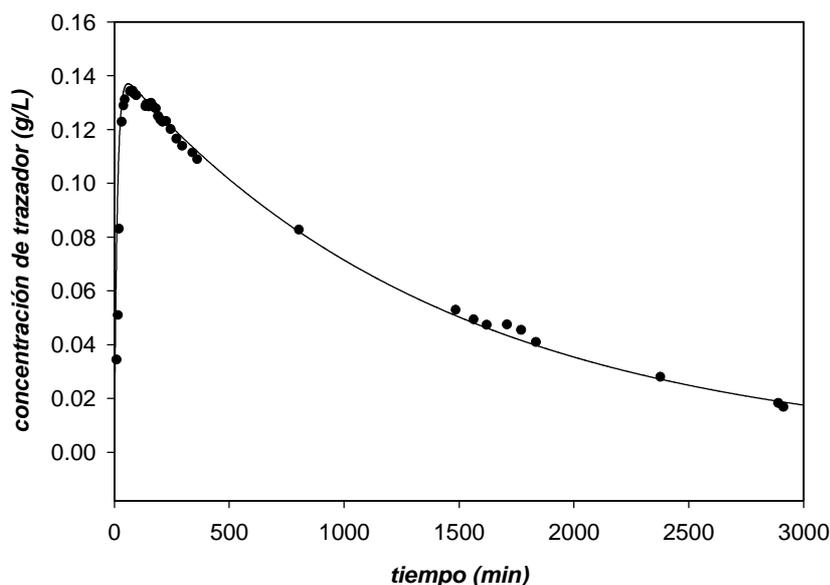


Figura 4.303.- Representación gráfica del experimento 1 de distribución del tiempo de residencia (relación de recirculación 1/15, 3 L/min de caudal de aeración), la línea continua representa el ajuste numérico del modelo de flujo.

Experimento 2

(Caudal de recirculación, q_r : 18 mL/min; caudal de aeración: 3 L/min; q : 2.8 mL/min; masa de trazador: 1 g)

En la **figura 4.304.** se presenta el ajuste realizado. Como resultado de la optimización numérica se obtuvo el siguiente valor de parámetro:

Coefficiente de retomezcla: 1.708 (caudal de retomezcla = 35.5 mL/min)

Estimación de la precisión del parámetro:

Nivel de confianza 95 % $1.63 \leq f \leq 1.79$

Nivel de confianza 99 % $1.61 \leq f \leq 1.81$

Bondad del ajuste (norma): 0.029

Experimento 3

(Sin recirculación, q_r : 0 mL/min; caudal de aeración: 3 L/min; q : 2.8 mL/min; masa de trazador: 1 g)

En la **figura 4.305.** se presenta el ajuste realizado. Como resultado de la optimización numérica se obtuvo el siguiente valor de parámetro:

Coefficiente de retomezcla: 19.41 (caudal de retomezcla = 54.3 mL/min)

Estimación de la precisión del parámetro:

Nivel de confianza 95 % $18.1 \leq f \leq 20.8$

Nivel de confianza 99 % $17.7 \leq f \leq 21.3$

Bondad del ajuste (norma): 0.14.

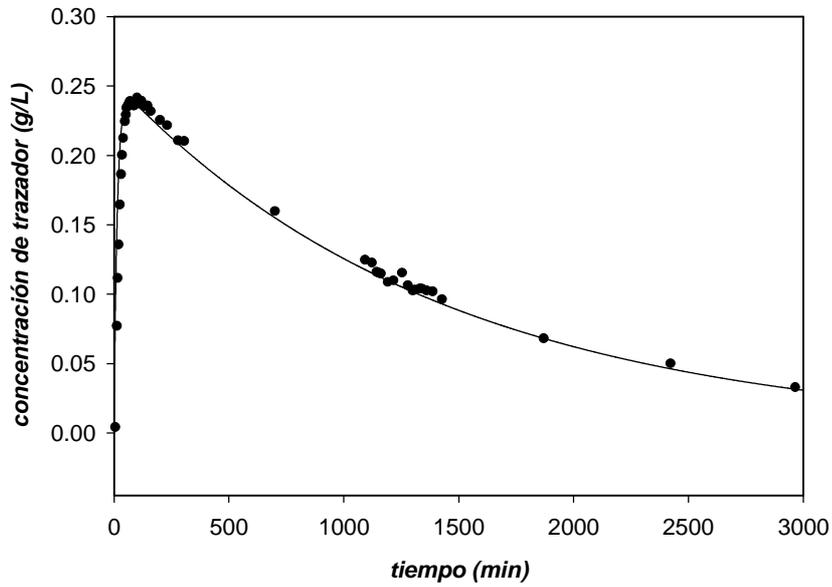


Figura 4.304.- Representación gráfica del experimento 2 de distribución del tiempo de residencia (relación de recirculación 1/6, 3 L/min de caudal de aeración), el ajuste numérico del modelo de flujo se representa con línea continua.

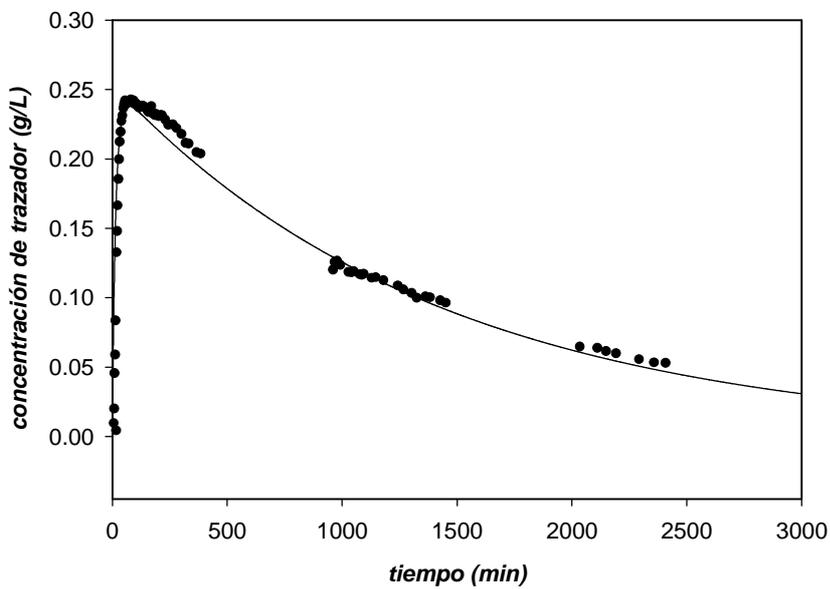


Figura 4.305.- Representación gráfica del experimento 3 de distribución del tiempo de residencia (sin recirculación, 3 L/min de caudal de aeración), el ajuste numérico del modelo de flujo se representa con línea continua.

Experimento 4**(Sin recirculación, q_r : 0 mL/min; sin aeración: 0 L/min; q : 2.8 mL/min; masa de trazador: 1 g)**

El modelo propuesto no puede reproducir este experimento, ya que la suposición de considerar tanques agitados en serie no se puede cumplir ya que el único elemento que provoca mezcla es el agitador magnético, y éste afecta principalmente al primer tanque. Por otra parte, no es de vital importancia que el modelo describa esta situación, ya que la función del tercer compartimento es la nitrificación y este proceso requiere aeración. Por tanto, esta situación que se aleja del modelo propuesto no se da en la operación real del reactor. En cualquier caso, sí que es importante resaltar el interés de este experimento, dado que permite observar claramente el efecto de mezcla asociado al caudal de gas utilizado en el reactor. Se puede ver como en ausencia de caudal de gas existe en el flujo una componente de flujo en pistón, como cabe esperar de la sección ocupada por el lecho empacado y también una distorsión del mismo, con una evidente dispersión que se debe asociar a la presencia de la sección inferior agitada del reactor.

A modo de recapitulación, por tanto, se puede decir que el modelo de flujo propuesto se ajusta de forma satisfactoria en los diferentes experimentos realizados. Con los ajustes realizados se observa que el caudal de retromezcla se ve afectado por la relación de recirculación. Al contrario que en los reactores a escala laboratorio, en los que el coeficiente de retromezcla se asociaba principalmente al caudal de aeración y al de recirculación, en el caso del reactor piloto, en el que el caudal de aeración es constante, el parámetro de ajuste (coeficiente de retromezcla) se ve afectado únicamente por la relación de recirculación utilizada.

De este modo se puede afirmar que el modelo de flujo propuesto es útil para describir la mezcla de la fase líquida del reactor piloto, pudiendo reproducir el flujo de la fase líquida si se fijan las condiciones de caudal de alimento y recirculación. Para ello es necesario determinar una relación directa entre el coeficiente de retromezcla y la relación de recirculación (dado que el caudal de gas es constante a lo largo de todos los periodos de operación realizados).

4.3.1.4.-Correlación entre parámetros y variables

La relación que se ha establecido entre el caudal de retromezcla y el caudal de recirculación es la siguiente:

$$\text{Caudal de retromezcla (mL/min)} = 53.83 - 0.9707 \cdot \text{caudal de recirculación (mL/min)} \quad (4.312.)$$

Coeficiente de correlación 0.998. En la **figura 4.306**. se presenta el ajuste realizado mediante el método de mínimos cuadrados.

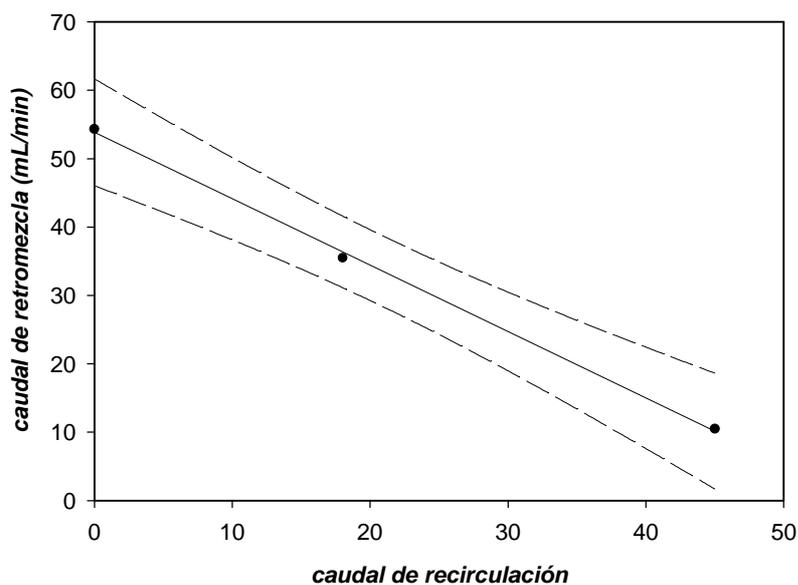


Figura 4.306.- Correlación entre la variable caudal de recirculación y el parámetro caudal de retromezcla. La línea continua representa el ajuste realizado por método de mínimos cuadrados y la línea discontinua (— — —) representa la región de confianza (nivel de confianza 95 %).

4.3.1.5.- Estudio del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida

El método “gas in-gas out” mediante sonda de oxígeno

Este método dinámico se ha aplicado al caso en el que la columna no está en operación, es decir sin células. Para ello, el oxígeno se purga de la fase líquida con ayuda de una corriente de nitrógeno, hasta conseguir un valor de oxígeno disuelto aproximadamente de cero. Entonces se introduce un caudal determinado de aeración y se realiza un seguimiento de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto con ayuda de dos electrodos (25/120, 322 Infit / Ingold / Urdorf, Suiza) situados en la parte superior e inferior del reactor (véase figura 3.1, en el capítulo *Materiales y Métodos*). Todos los experimentos se realizan a una temperatura de 30 °C.

Para utilizar este método de determinación del coeficiente $K_L a$ es necesario determinar la constante de tiempo de la sonda de oxígeno utilizada, para incluirla en la ecuación con la que se ajustará el valor del coeficiente mediante optimización por mínimos cuadrados no lineal (tanto el método como la ecuación se han descrito ya en el capítulo *Materiales y Métodos* y en el apartado 4.2.2.3.). A partir del ajuste realizando se estimó que la constante de tiempo de la sonda de oxígeno es de (25.0 ± 0.4) s, el coeficiente de correlación es de 0.998., en la **figura 4.307**. se presenta el experimento realizado para la determinación de esta constante de tiempo.

Se estudió el efecto del caudal de aeración, el caudal de recirculación y la velocidad del agitador magnético situado en la sección inferior del reactor. Los resultados de las determinaciones realizadas y de las condiciones en las cuales se realizaron los experimentos se presentan en la **tabla 4.305**. Un ejemplo de la determinación del coeficiente K_{La} se muestra en la **figura 4.308**.

Tabla 4.305.- Condiciones de operación y resultados de los experimentos de determinación del coeficiente de transferencia de materia de la fase gas a la líquida para el oxígeno, método físico mediante electrodo de oxígeno. El error en el ajuste del coeficiente K_{La} no supera el 2 %.

Sección del reactor	Caudal de gas (L/min)	Agitación (r.p.m.)	Caudal de recirculación (mL/min)	K_{La} (s^{-1})
superior	3	400	18.0	0.014
superior	3	400	45.0	0.014
superior	3	200	18.0	0.014
superior	5	400	18.0	0.023
inferior	3	400	18.0	0.018
inferior	3	400	45.0	0.018
inferior	3	200	45.0	0.013
inferior	5	400	18.0	0.024

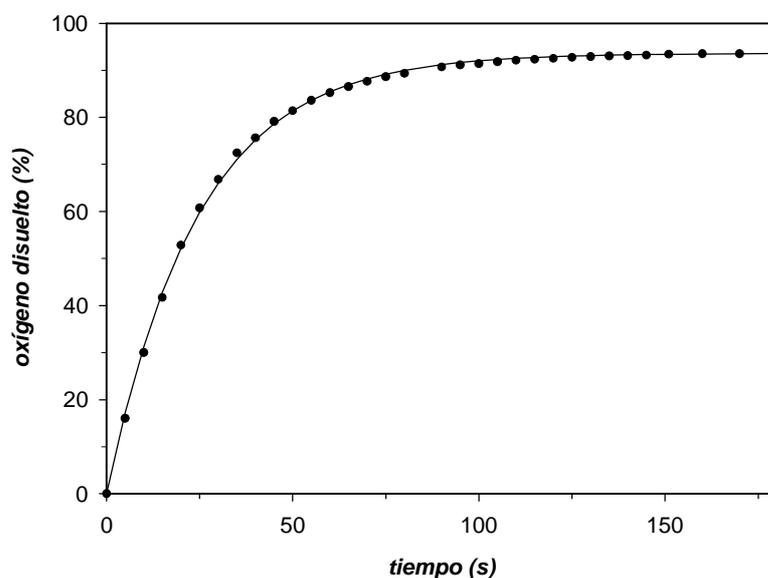


Figura 4.307.- Determinación de la constante tiempo de respuesta de la sonda de oxígeno disuelto. La línea continua representa la optimización numérica realizada (método de mínimos cuadrados). La bondad del ajuste no se representa gráficamente, ya que el error es menor al 2 %.