

PRETRATAMIENTOS MECÁNICOS Y DISTRIBUCIÓN GRANULOMÉTRICA EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

CHIARA BARILARO

Cbarilaro@gmail.com

Politécnico de Turín. (Italia)

Resumen

Los combustibles fósiles, debido a sus orígenes ancestrales y a su disponibilidad finita, presentan incertidumbres en cuanto a su suministro futuro. Su extracción y uso tienen importantes repercusiones negativas sobre el medio ambiente, como la contribución al cambio climático, las emisiones de gases de efecto invernadero y la lluvia ácida, así como efectos adversos sobre la salud humana. Por consiguiente, es crucial reducir la dependencia del petróleo y garantizar un futuro energético sostenible. Los biocombustibles surgen como una alternativa prometedora a los combustibles fósiles y se clasifican en cuatro generaciones: Primera generación, derivados de aceites vegetales (biodiésel) y de la fermentación de azúcares simples de cultivos de azúcar y almidón (etanol), incluido el biogás; Segunda generación, producidos a partir de biomasa lignocelulósica, residuos agrícolas o material vegetal de desecho, que son materias primas sostenibles no destinadas al consumo humano; Tercera generación, implica el cultivo de algas que no requieren tierras cultivables y pueden fijar CO₂; Cuarta generación, incluye los electrocombustibles y los combustibles solares fotobiológicos, que no necesitan la destrucción de biomasa a diferencia de los biocombustibles de tercera generación. Entre ellos, el biogás, biocombustible de segunda generación, se produce mediante digestión anaerobia (DA) de diversos materiales orgánicos como lodos de depuradora, residuos zootécnicos, biomasa agrícola y otros productos de desecho. Este proceso no sólo ofrece una fuente de energía renovable, sino que también resuelve los problemas de gestión de residuos. Hacer hincapié en el desarrollo y la utilización de biocombustibles, especialmente los de segunda generación y posteriores, puede mitigar significativamente los impactos medioambientales y sanitarios asociados a los combustibles fósiles, al tiempo que garantiza un futuro energético más sostenible.

Palabras clave: combustibles fósiles, biocombustibles, primera generación, segunda generación, tercera generación, cuarta generación, digestión anaerobia, biogás, energías renovables, sostenibilidad.

RECIBIDO: 09-01-2024 / ACEPTADO: 11-07-2024 / PUBLICADO: 30-09-2024

Cómo citar:

Barilaro Ch. (2024). Pretratamientos mecánicos y distribución granulométrica en la digestión anaerobia. *Anales*, 40, 59 - 88. <https://doi.org/10.58479/acbfm.2024.115>



CONTENIDO

Resumen	59
1. Introducción a la digestión anaerobia	63
1.1 Microbiología de la digestión anaerobia	66
1.1.1 Hidrólisis	68
1.1.2 Acidogénesis	69
1.1.3 Acetogénesis	69
1.1.4 Metanogénesis	70
1.1.4.1 Bacterias y reacciones implicadas	70
1.2 Consorcios microbianos	71
1.2.1 Clostridios	71
1.2.2 Bacilos	73
1.3 Flexibilidad de las materias primas	74
1.4 Pretratamiento	75
1.4.1 Métodos mecánicos de pretratamiento	75
1.4.1.1 Cizalla	76
1.4.1.2 Molienda de bolas	76
1.4.1.3 Homogeneización a alta presión	78
1.4.1.4 Degradación rotor-estator	78
1.4.1.5 Ultrasonificación	79
1.4.2 Térmico	81

1.4.3	Métodos de pretratamiento químico	82
1.4.3.1	Pretratamiento alcalino	82
1.4.3.2	Pretratamiento ácido	83
1.4.3.3	Pretratamiento oxidativo	83
1.4.4	Métodos biológicos de pretratamiento	83
1.4.4.1	TSAD	83
1.4.4.2	Método de pretratamiento enzimático	84
1.4.5	Tensión de cizallamiento inducida en bacterias	84
1.5	Reflexión láser in situ	86
1.6	Distribución de probabilidades	87

1. Introducción a la digestión anaerobia

Los combustibles fósiles, como su nombre indica, son muy antiguos. Debido a este hecho y también a la limitada cantidad disponible de estos recursos, su suministro futuro es incierto. Además, la explotación de estos recursos tiene efectos indeseables sobre el medio ambiente, en lo que se refiere a cuestiones climáticas, emisiones de gases de efecto invernadero y formación de lluvia ácida, además de los efectos negativos sobre la salud humana. Por ello, es conveniente reducir la dependencia del petróleo y asegurar el suministro futuro de energía. En esta línea, los biocombustibles intervienen como alternativa a los combustibles fósiles; se agrupan principalmente en *cuatro generaciones* [1]:

- Los biocarburantes de primera generación son el biodiésel a partir de aceites vegetales y el etanol a partir de la fermentación de azúcares simples contenidos en los cultivos de azúcar o almidón y el biogás;
- Los biocarburantes de segunda generación se fabrican a partir de biomasa lignocelulósica, residuos agrícolas o desechos vegetales, es decir, materias primas sostenibles que no se destinan al consumo humano;
- La tercera generación de biocombustibles se basa en el cultivo de algas, que no utilizan tierras cultivables y fijan CO₂;

Los biocombustibles de cuarta generación, a diferencia de los de tercera, no requieren la destrucción de biomasa e incluyen los electrocombustibles y los combustibles solares fotobiológicos.

El biogás es un biocombustible de Segunda Generación producido mediante el proceso de Digestión Anaerobia (DA) a partir de diferentes materias orgánicas, como lodos de depuradora, residuos zootécnicos, biomasa agrícola y otros residuos (Tabla 1.1).

El biogás se compone de metano (50-70%), dióxido de carbono (30-50%) y algunas impurezas, como amoníaco, sulfuro de hidrógeno, siloxano y haluros. El valor calorífico del biogás depende únicamente del contenido de metano; el biogás que contiene un 55% de CH₄ tiene un valor calorífico de 21,5 MJ/Nm³ mientras que el metano puro tiene un valor calorífico de 35,8 MJ/Nm³ [2]. Por este motivo, el CO₂ debe eliminarse y destinarse a otros fines (Figura 1.1).

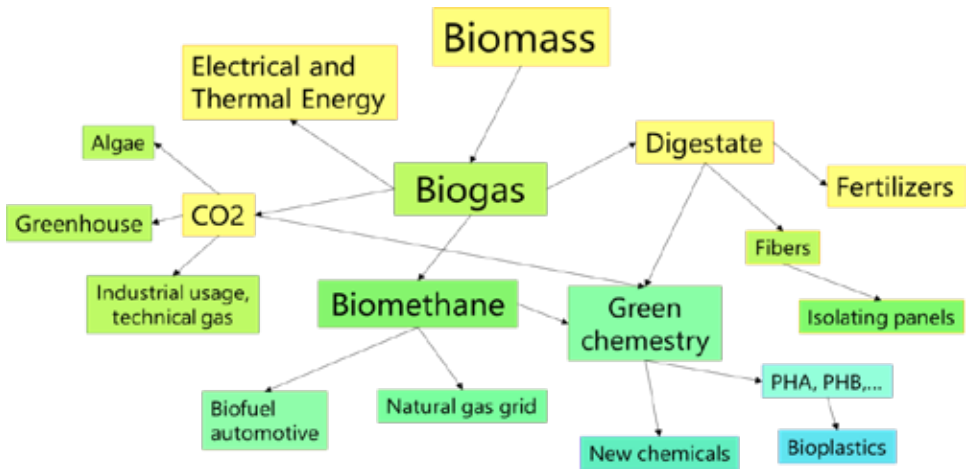


Figura 1.1: Desarrollo de la cadena de producción de biogás [3].

Tabla 1.1: Residuos industriales susceptibles de AD [4].

Sustrato	Ejemplo de sustrato	Rendimiento en biogás (m ³ /tonelada de VS)	CH4 en biogás (%)
Aguas residuales		300-550	60-65
	Bovino	300-450	60-65
	Carne de cerdo	450-550	60-65
Estiércol		200-550	60-65
	Bovino	200-300	60-65
	Carne de cerdo	450-550	60-65
	Ovino	240-500	60-65
Cultivos dedicados		300-650	50-60
	Ensilado de maíz	350-550	53-55
	Remolacha	450-550	55-60
	Hierba	300-500	53-55
	Trébol	300-500	50-55
Subproductos agroindustriales		300-600	50-60
	De la elaboración de zumos	500-600	55-60
	Granos de cervecería	300-400	50-55
	Melaza	300-450	50-55
	Paja	450-550	53-55
	De la destilación de cereales	400-500	50-55
	Residuos		300-850
	Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos	300-450	50-60
	De los servicios alimentarios	650-800	50-60

El número de plantas de biogás en Europa prácticamente se triplicó en solo 6 años, alcanzando el valor de 17.376 plantas de biogás en 2015. Con 1.550 plantas de biogás, Italia ocupa el segundo lugar después de Alemania, que cuenta con 10.846 (Figura 1.2).

En Alemania, en 2011 se generaron unos 18.000 millones de kWh de electricidad a partir de biogás, lo que supone suministrar electricidad a unos cinco millones de hogares [5]. Cuando el biogás se convierte en electricidad en unidades de cogeneración, también se produce calor: con unos 18.000 millones de kWh, se suministra calor a más de 530.000 viviendas [5]. Además, una vez convertido en biometano, el biogás es un combustible similar al gas natural. Por tanto, el biometano puede utilizarse como combustible en vehículos propulsados por gas natural sin modificaciones técnicas. Casi 200 de las cerca de 900 estaciones de servicio de gas natural venden combustible que contiene entre un 5% y un 100% de biometano [5].

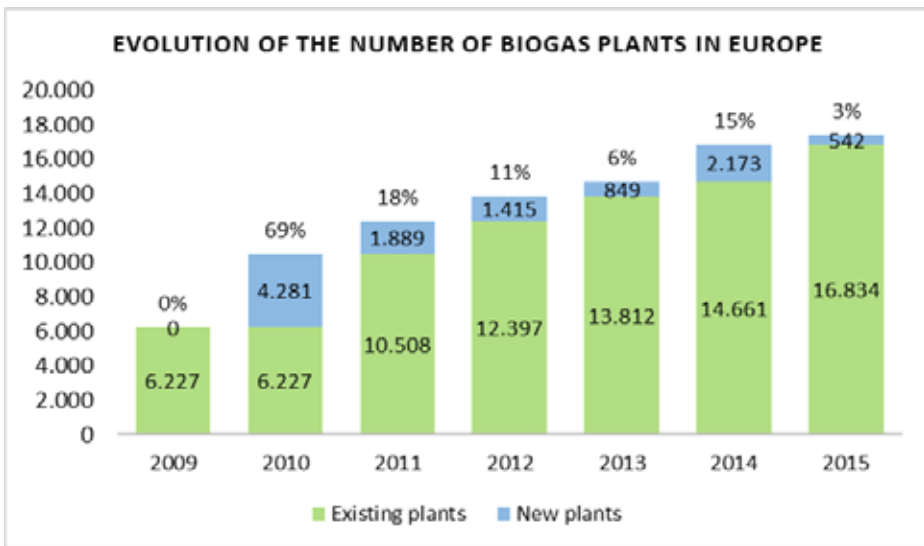


Figura 1.2: Plantas de biogás [6].

1.1 Microbiología de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia representa un proceso catabólico, en el que las bacterias degradan el sustrato utilizando enzimas. Éstas son de naturaleza proteica y pueden catalizar reacciones bioquímicas gracias a sitios activos. Además, pueden clasificarse a grandes rasgos como endoenzimas o exoenzimas; ambas se producen en la célula, pero las segundas se liberan fuera de ella (Figura 1.3). Para garantizar la presencia de las exoenzimas y endoenzimas adecuadas para la degradación de los sustratos se requiere una comunidad bacteriana amplia y diversa, ya que ninguna bacteria las produce todas por sí sola (Tabla 1.2).

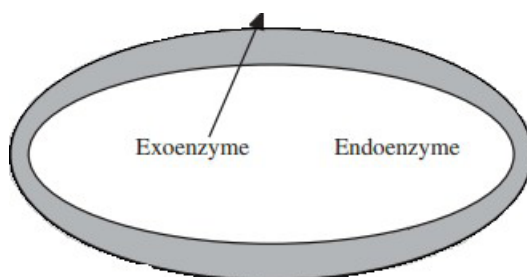


Figura 1.3: Enzimas utilizadas por las bacterias para degradar el sustrato [7].

La actividad bacteriana en la AD puede ser anaeróbica estricta/facultativa (digestión de lodos) o aeróbica estricta (estabilización de lodos). Los aerobios obtienen energía biosintética y producen metabolitos sólo en presencia de oxígeno molecular libre, ya que producen ATP a través de la respiración aeróbica. Estrictamente

En cambio, los anaerobios son inactivos en presencia de oxígeno molecular libre. Carecen de ciertas enzimas esenciales para que las bacterias sobrevivan en presencia de oxígeno, ya que eliminan las especies reactivas del oxígeno. Éstas resultan de la reducción del oxígeno molecular y causan daños intracelulares. Mientras que el término anaerobio facultativo establece una condición de crecimiento ideal para la ausencia de oxígeno, pero, si la presión parcial de oxígeno aumenta en el medio, no es tóxico para estos microorganismos y pueden seguir creciendo. Ciertas especies, llamadas microaerófilas, en cambio, crecen mejor en presencia de bajas cantidades de oxígeno.

Tabla 1.2: Exoenzimas y sustratos [7].

Sustrato	Ejemplo	Exoenzima	Bacteria	Producto	Rendimiento (m ³ CH ₄ /kg) [4]
Polisacáridos	Sacarolítico	Celulasa	Cellulomonas	Azúcares simples	0,40
Proteínas	Proteolítica	Proteasa	Bacillus	Aminoácidos	0,50
Lípidos	Lipolítico	Lipasa	Mycobacterium	Ácidos grasos	0,85

El proceso de AD se compone de diferentes etapas (Figura 1.4), como se explica brevemente a continuación. Antes de la DA, la materia prima se prepara eliminando contaminantes como arenilla, metales y otras partículas dependiendo de la fuente específica del sustrato.

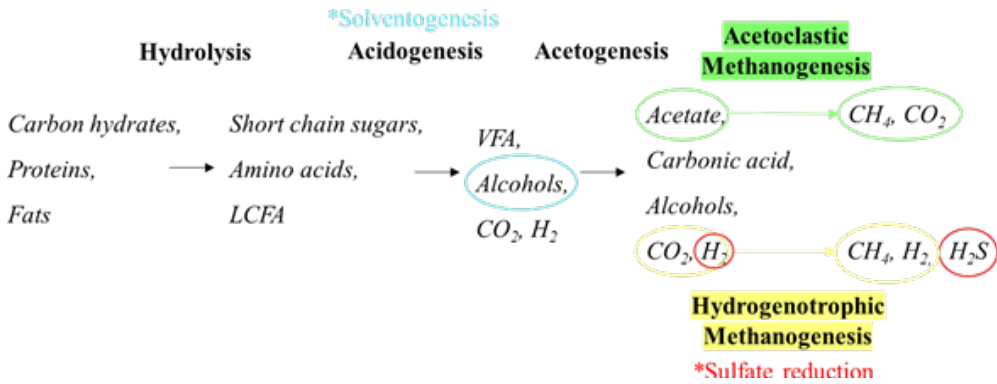


Figura 1.4: Bioquímica de la EA.

En cada fase, un grupo metabólico de microorganismos es más activo que los demás: los microorganismos que desempeñan un papel clave en las tres primeras etapas de la AD (bacterias hidrolíticas-fermentativas, bacterias acidogénicas) forman parte del dominio *Bacteria*, en cambio, en la última etapa, los metanógenos acético-lásticos y los metanógenos hidrogenotróficos son miembros del dominio *Archaea* (Figura 1.5).

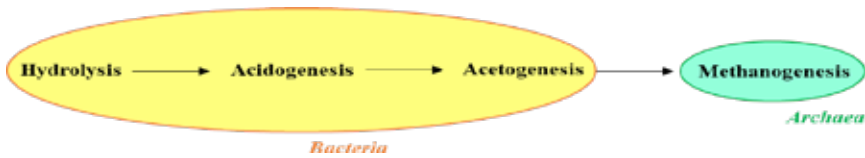


Figura 1.5: Dominio de los microorganismos en las fases de AD.

1.1.1 Hidrólisis

La primera etapa del proceso, *la hidrólisis*, consiste en la desintegración de la materia prima operada por bacterias anaerobias facultativas y obligatorias mediante la producción de exoenzimas (hidrolitos). Los carbohidratos (como la celulosa) se descomponen en azúcares simples; las proteínas se convierten en aminoácidos individuales; mientras que a las grasas, ésteres del alcohol, glicerol y tres cadenas de ácidos grasos, se les eliminan las últimas partes del grupo de cabeza. Cuando el sustrato es complejo, este paso es el que determina la velocidad.

1.1.2 Acidogénesis

Durante la segunda etapa, *la acidogénesis*, los monómeros formados en la etapa de hidrólisis se convierten en ácidos orgánicos de cadena corta (C1-C5) (ácido butírico, ácido propiónico, ácido acético), alcoholes, algunos compuestos orgánicos nitrogenados y orgánicos azufrados, junto con hidrógeno y dióxido de carbono. También se conoce comúnmente como el primer paso fermentativo. Un valor de pH inferior a 5,5 induce la producción de *disolventes* (como alcoholes y acetona); las células entran en la segunda fase, conocida como *solvogénesis*.

- Vías de degradación de los azúcares:
 - formación de ácido propiónico por la vía del succinato y la vía acrílica (degradación del piruvato);
 - formación de ácido butírico a través de la vía del ácido butírico;
- Vías de degradación de los ácidos grasos: β -oxidación (paso a paso, en cada paso se libera un acetato).
- La vía de degradación de los aminoácidos es la reacción de Stickland (se desdoblan dos aminoácidos a la vez: uno actúa como donante de hidrógeno y el otro como aceptor). Durante el desdoblamiento de la cisteína se libera ácido sulfhídrico.

Con el desarrollo del crecimiento bacteriano de película fija en digestores anaerobios, muchos residuos orgánicos solubles pueden digerirse rápida y eficazmente [7].

1.1.3 Acetogénesis

El tercer paso, *la acetogénesis*, o segunda fermentación, implica la conversión de los ácidos volátiles (AGV) (1.1) [8] y los alcoholes en ácido acético y gas hidrógeno.



Las bacterias acetogénicas son productoras obligatorias de H_2 , inhibidas por una cantidad excesiva del producto (hidrógeno). Entonces, debe existir una relación sintrófica entre los acetógenos y los metanógenos hidrogenotróficos [9]. La sintropía es el fenómeno por el cual una especie vive de los productos de otra especie [9]. En efecto, las segundas retiran constantemente del sustrato los productos del metabolismo de las primeras, manteniendo la presión parcial de hidrógeno a un nivel bajo, adecuado para las bacterias acetogénicas. Pueden surgir problemas cuando los acetógenos crean una relación sintrófica en lugar de con una especie metanogénica con otros organismos, que compiten con los metanógenos por el H_2 . En la tecnología de aguas residuales, algunos anaerobios facultativos reducen el sulfato (SO_4^{2-}) a sulfuro de hidrógeno (Figura 1.6). En este caso, los metanógenos hidrogenotróficos forman menos metano (reciben menos alimento) y también se ven afectados tóxicamente por el sulfuro de hidrógeno. Además, muchos de los monómeros (por ejemplo, los azúcares) pueden ser catabolizados por bacterias homoacetogénicas en acetato, que luego sirve de sustrato para los metanógenos acetoclásticos que lo convierten en CH_4 y CO_2 .

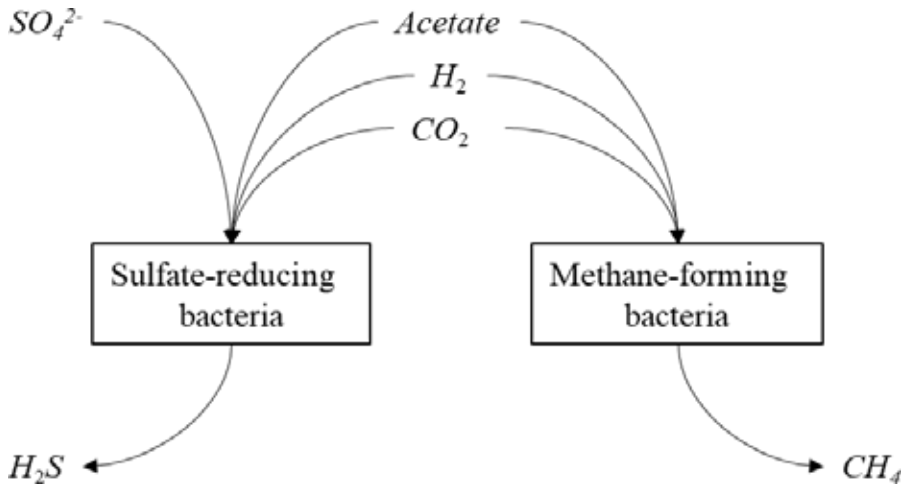


Figura 1.6: Competencia entre bacterias reductoras de sulfato y bacterias formadoras de metano [7].

1.1.4 Metanogénesis

1.1.4.1 Bacterias y reacciones implicadas

Bacterias formadoras de metano, agrupadas en el dominio *Archaea* (Figura 1.3), que reúne un amplio espectro de microorganismos que viven en ambientes extremos, prohibitivos para todos los demás organismos (bacterias formadoras de metano, extremadamente halófilas, termoacidófilas, extremadamente termófilas). Debido al largo tiempo de reproducción, se requiere un largo periodo de retención en el digestor (al menos 12 días). Las bacterias formadoras de metano crecen como consorcios microbianos, son anaerobias obligadas y crecen en un número limitado de sustratos simples. Obtienen energía y componentes básicos para la biosíntesis a partir de hidrógeno, compuestos 1-C (formiato, metanol, dióxido de carbono, monóxido de carbono y metilamina) y acetato (2-C). Se distinguen principalmente dos grupos: los metanógenos hidrogenotróficos y los metanógenos acetoclásticos, que convierten el hidrógeno y el carbono en acetato Dióxido de carbono o ácido acético, respectivamente, a metano. La producción de metano se produce, por tanto, a partir de la degradación del acetato (1.1) y la reducción del dióxido de carbono por el gas hidrógeno (1.2) [7]. Se cree que las segundas vías representan alrededor del 27-30% de la producción de CH_4 en los reactores de AD.



1.1.5 Fundamento energético

Si sólo se considera la glucosa como sustrato de la AD (sustancia más fermentable), la reacción de combustión (1.4) liberaría unos 2870 kJ, mientras que la reacción de conversión de glucosa en metano a través de la AD (1.3) libera sólo 390 kJ.



Los microorganismos aprovechan la energía presente en los enlaces carbono-carbono, provocando un cambio en el estado de oxidación de los átomos de carbono de 0 en la glucosa a -4 en el metano. En el nuevo estado de oxidación se encuentra la energía, que se almacena de esta forma en el producto (metano) y no se libera; como muestra claramente la energía libre de Gibbs de 1,4, inferior a la de 1,3. Esta energía almacenada puede aprovecharse posteriormente, por ejemplo mediante combustión. Si éste es el caso, el LHV del metano es de unos 800 kJ/mol y, puesto que se ganan 3 mol de metano, la cantidad de energía obtenida teóricamente es de unos 2400 kJ/mol, cercana a la energía libre de Gibbs de la reacción 1.3. Aunque la $|\Delta G|$ es mayor en la reacción de combustión, la biomasa puede contener una gran cantidad de agua que debería vaporizarse, pero el proceso AD ocurre en presencia de agua. Además, el proceso se lleva a cabo a bajas temperaturas, en un modo de funcionamiento continuo estable y sin necesidad de luz (garantizando una producción de 24 horas).

1.2 Consorcios microbianos

Los filos de bacterias responsables de la AD son Firmicutes y Archaea. Las Firmicutes son las bacterias fermentadoras sintróficas responsables de la digestión de los AGV (véase el capítulo 1.1.3). Debido a la gran disponibilidad de AGV, los Firmicutes son cuantitativamente dominantes en el digestor. El filo Firmicutes se compone principalmente de dos clases: Clostridia (13%) y Bacilli (76%) [11].

1.2.1 Clostridios

Los clostridios son una clase de bacterias Gram-positivas, con forma de bastoncillos y formadoras de endosporas (véase el capítulo 1.2.2). Las endosporas son el “estado latente” al que pueden reducirse las bacterias en condiciones ambientales estresantes, también durante periodos muy largos. Además, los Clostridios son anaerobios o aerotolerantes y pueden considerarse los predecesores evolutivos de los Bacilos.

Esta clase de microorganismos incluye organismos saprótrofos (descomponedores), que viven en hábitats anaeróbicos que contienen materia orgánica, como suelos, sedimentos acuáticos y tejidos anaeróbicos (como el tracto intestinal de los animales). Como tales, tienen un metabolismo de tipo estrictamente fermentativo por el que convierten muchos carbohidratos

simples y complejos (por ejemplo, celulosa), así como CO₂/H₂ o CO, (Tabla 1.3) pero también aminoácidos, proteínas y otras moléculas orgánicas.

Tabla 1.3: Sustratos que pueden utilizar los clostridios [12]. BW corresponde a residuos de biomasa (por ejemplo, agrícolas) y OW a otros residuos (por ejemplo, lodos).

Materia prima	Sustrato	Subunidad monomérica	Grupo Clostridia
Cultivos	Melaza	Glucosa, Fructosa	Solventogénico
Cultivos	Almidón	Glucosa	Solventogénicos, algunos celulolíticos
Cultivos, BW	Celulosa	Glucosa	Celulolítico, algunos Solventogénico
Cultivos, BW	Hemicelulosa	Glucosa, Xilosa, Manosa, Galactosa, Ramnosa, Arabinosa	Celulolítico, Solventogénico
Cultivos, BW	Pectina	Ácido galacturónico, ramnosa	Celulolítico, Solventogénico
OW	Glicerol		Solventogénico
	Camino del queso	Lactosa	Solventogénico
OW	Ácidos grasos de cadena corta (acético, butírico, láctico)		Solventogénico
OW	Desconocido		Celulolítico, Acetógeno
Cultivos, BW, OW	CO ₂ /H ₂ , CO		Acetogen

Los productos pueden ser gases (como CO₂ y H₂), alcoholes, ácidos carboxílicos, cetonas de C₂ a más de C₈ (Tabla 1.4). Durante el crecimiento, primero se produce la fase acidogénica, luego, a medida que el pH disminuye debido a la acumulación de ácidos, el cultivo entra en la fase estacionaria, pasando a la fase solventogénica (ver Figura 1.2). En efecto, un valor de pH inferior a 5,5 induce la producción de disolventes, como alcoholes y acetona (es decir, *solventogénesis*). En esta fase, cepas como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium saccharobutylicum* y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* producen butanol en alta concentración con acetona (o isopropanol) y etanol. Este proceso se denomina fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) [13].

Los Costridia engloban también muchos acetógenos que fijan CO₂ (utilizando por ejemplo H₂) o CO (solos) y utilizan compuestos de un solo carbono (por ejemplo formiato o metanol), algunos de ellos son *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium carboxidivorans*.

Los clostridios celulolíticos digieren la celulosa, como *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum* y *Clostridium phytofermentans*.

Por último, cuando los clostridios crecen sobre aminoácidos o ácidos grasos, se producen compuestos malolientes.

Tabla 1.4: Productos de clostridios [12].

	Productos	Organismos
gas	H ₂ , CO ₂	Acetógenos, Solventógenos,
2-C	Etanol, ácido acético	Celulolíticos
3-C	Propanona, Ácido propiónico, Propanol, 1,3-propanediol, Lactato, Acrilato	Solventogénico, Propiónico, otros
4-C	Ácido butírico, Butanol, Acetoína, Succinato, 2,3-butanodiol	Acetógenos, Solventógenos, otros
5-C	Ácido pentanoico (Valeric a.)	<i>C. scatologenes</i> , <i>C. kluveri</i> , otros
6-C	Ácido hexanoico (Caproico a.), Hexanol, 2-hidroxi-4-metilpentanoato	<i>C. scatologenes</i> , <i>C. kluveri</i> , <i>C. butyricum</i>
8-C	Ácido octanoico (Caprílico a.)	<i>C. kluveri</i>

1.2.2 Bacilos

Los bacilos son una clase de bacterias Gram-positivas, en forma de bastoncillos y formadoras de endosporas. Los bacilos son aerobios obligados o anaerobios facultativos y pueden considerarse sucesores evolutivos de los Firmicutes Clostridia anaerobios.

Durante la producción de H₂ por la población bacteriana anaerobia (Clostridia) y facultativa (Bacilli) en la fermentación, varias vías metabólicas pueden estar presentes simultáneamente durante la producción de H₂. La Figura 1.7 muestra algunas de las vías metabólicas alternativas.

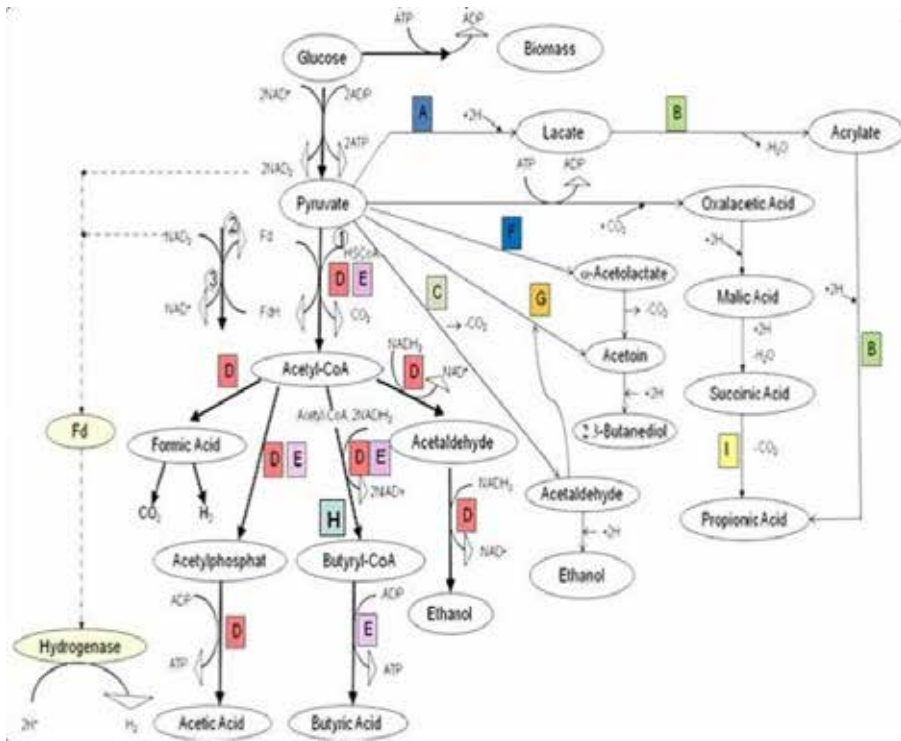


Figura 1.7: Vía metabólica de la glucosa por bacterias productoras de hidrógeno en AD [14]. Las letras indican los organismos que llevan a cabo la reacción: A, bacterias lácticas (*Streptococcus*, *Lactobacillus*); B, *Clostridium propionicum*; C, Levaduras, *Acetobacter*, *Zymomonas*, *S. ventriculi*, *E. amylovora*; D *Enterobacteriaceae* (*coli-aerogens*); E, *Clostridia*; F, *Aerobacter*; G, Levaduras; H, *Clostridia* (organismos butíricos, butílicos); I, Bacterias del ácido propiónico.

1.3 Flexibilidad de las materias primas

En ausencia de nutrientes esenciales, el crecimiento del microorganismo se detiene. Por lo tanto, a menudo es necesario suministrar nutrientes esenciales junto con el sustrato. Los nutrientes esenciales pueden dividirse en macronutrientes (fuente de carbono y fuente de nitrógeno) y micronutrientes (oligoelementos). Como fuente de carbono, por ejemplo, el azúcar se consume muy rápidamente, a diferencia de la lignocelulosa, que, de hecho, está formada por tres tipos de polímeros (es decir, celulosa, hemicelulosa y lignina) fuertemente entrelazados por enlaces covalentes y fuerzas no covalentes. Además, los productos intermedios del metabolismo también pueden tener un efecto limitador o incluso inhibidor.

En general, toda biomasa puede utilizarse como sustrato si contiene carbohidratos, proteínas, grasas, celulosa y hemicelulosa como componentes principales. Ya se han utilizado diferentes residuos; la forma va desde sólidos, semisólidos y líquidos, como estiércol o

subproductos de la industria, granjas agrícolas, plantas de eliminación, etc. El uso de más de un sustrato (codigestión) para la producción de biogás presenta algunas ventajas, entre las que se incluyen: una tasa de degradación más rápida, rentabilidad en términos de formación de productos, optimización de los contenidos de humedad y nutrientes y reducción de la concentración de compuestos inhibidores [14]. Por ejemplo, hoy en día en la mayoría de los biogás agrícolas.

Las plantas de estiércol líquido se fermentan muy a menudo combinadas con diferentes co-sustratos, como los cultivos energéticos [14]. La adición de residuos orgánicos sólidos al estiércol líquido puede aumentar la producción de biogás (por volumen de digestor), gracias al mayor contenido de sustancias orgánicas fácilmente degradables. El mismo planteamiento es válido para los lodos de depuradora, cuyos co-sustratos consisten en este caso en materiales flotantes, como los restos de grasa procedentes del sacrificio de cerdos.

1.4 Pretratamiento

Dado que el proceso biológico anaeróbico es tan lento, su viabilidad económica se vuelve cuestionable y, por tanto, las instituciones dudan en invertir en cualquier forma de este proceso potencialmente sostenible [16]. En general, se ha determinado que la hidrólisis es el paso clave para determinar la velocidad del proceso de digestión, debido a la presencia de matrices difícilmente degradables en los sustratos. En base a esto, se han llevado a cabo diferentes métodos de pretratamiento destinados a mejorar la hidrólisis [17]. El problema radica en los materiales lignocelulósicos y su especificidad se refiere al comportamiento de la lignina como barrera que impide la biodegradación. Pretratar el sustrato antes de que entre en el reactor anaerobio significa romper la lignina y la hemicelulosa y reducir la estructura cristalina de la celulosa. De esta forma, la superficie disponible expuesta al ataque de los microorganismos es mayor y se promueve una digestión más rápida. Los pretratamientos aplicables en la actualidad se clasifican en diferentes categorías:

- mecánicos (esmerilado, ultrasonidos, etc.)
- térmico
- química (mediante el uso de alcoholes, ácidos, ozono, etc.)
- biológica (por microorganismos específicos o por enzimas específicas) La clasificación se ilustra más ampliamente a continuación.

1.4.1 Métodos mecánicos de pretratamiento

El pretratamiento mecánico da lugar a partículas más pequeñas o a trozos de sustrato aplastados. De hecho, el tamaño de las partículas puede afectar a la velocidad de la digestión anaerobia, ya que afecta a la disponibilidad de un sustrato (es decir, a la superficie) para las enzimas hidrolizantes. Esto es especialmente cierto en el caso de las fibras vegetales; se llevó a cabo la AD de residuos de fibra de sisal pretratados y no pretratados y el rendimiento de

metano aumentó en un 23% (de 0,18 m³ CH₄/kgVS a 0,22 m³ CH₄/kgVS) cuando el tamaño de la fibra se redujo a 2 mm (de 100 mm) con un pretratamiento de cizallamiento. [18]. Además, la viscosidad en el digester disminuye como consecuencia de la reducción del tamaño de las partículas, lo que facilita la mezcla, ya que el sistema resulta más homogéneo.

1.4.1.1 Cizalla

Se pueden utilizar molinos de cuchillas o trituradoras para, respectivamente, cortar o triturar el sustrato. Los molinos de cuchillas se suelen utilizar para materias primas húmedas, que se cortan continuamente hasta que son lo suficientemente pequeñas como para pasar por una criba de clasificación [19]. Las trituradoras se limitan a biomasa con un contenido de humedad inferior al 15% [20], pero muchas trituradoras industriales utilizan sustratos con contenidos de humedad mucho más elevados.

1.4.1.2 Molienda de bolas

En este pretratamiento, se lanzan perlas de vidrio (medios de molienda) contra las células. Se obtiene la aceleración de las perlas:

- agitando todo el recipiente (figuras 1.8 y 1.9);

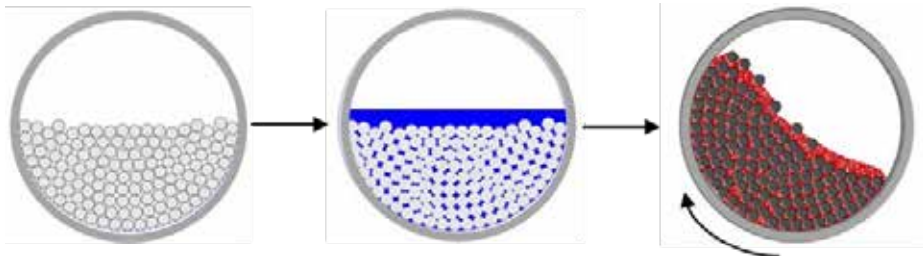


Figura 1.8: Fresado de microesferas en el que se agita todo el recipiente [21].



Figura 1.9: Ejemplo de fresadora de cuentas con 2 contenedores [22].

- mediante un agitador giratorio dentro del recipiente (figura 1.10).

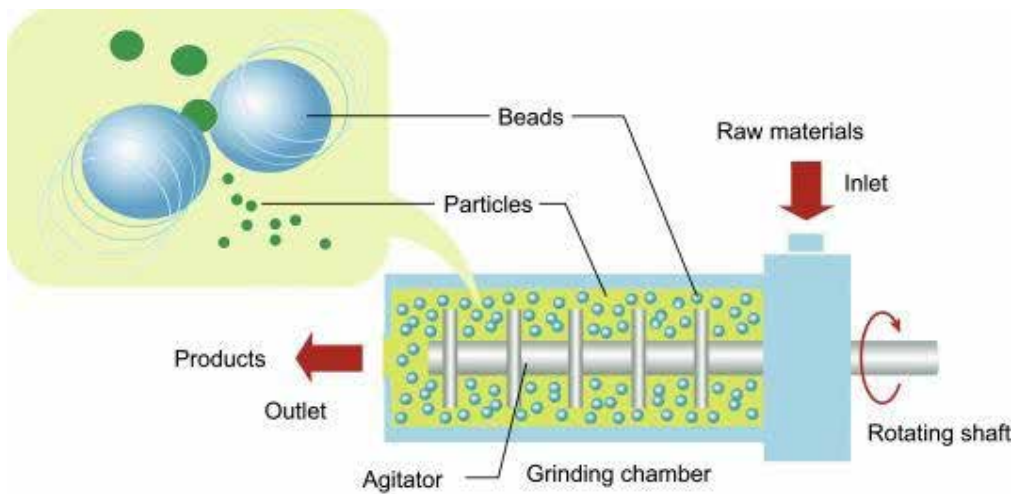


Figura 1.10: Molienda de microesferas en la que un agitador giratorio acelera las microesferas [23].

1.4.1.3 Homogeneización a alta presión

La presión aumenta hasta varios cientos de bares y, a continuación, la suspensión se homogeneiza bajo una fuerte despresurización. La prensa francesa es un ejemplo de homogeneizador de alta presión. Funciona aplicando primero una presión de 83 MPa sobre el lodo y liberándola después rápidamente abriendo una válvula de aguja. La disminución de la presión crea una fuerza de cizallamiento muy elevada sobre las partículas, haciéndolas estallar.

1.4.1.4 Degradación rotor-estator

El homogeneizador rotor-estator está compuesto por un eje metálico giratorio (*rotor*) dentro de un tubo estacionario de extremo abierto (*estator*), éste tiene forma de ranura en el extremo (Figura 1.11).



Figura 1.11: Rotor y estator [24].

La rotación del rotor crea un efecto de succión que atrae la muestra hacia el espacio entre el rotor y el estator, aquí la muestra está sujeta a altas fuerzas de cizallamiento debido al pequeño espacio y se produce la homogeneización (Figura 1.12).



Figura 1.12: Cizallamiento rotor-estator por eje giratorio, vista interior [25].

1.4.1.5 Ultrasonificación

Los ultrasonidos pueden aplicarse *indirectamente* a través de un baño o *directamente* mediante una sonda. La sonicación directa, al estar la sonda en contacto directo con la muestra, garantiza un funcionamiento más eficaz. En efecto, el tratamiento se basa en la utilización de ondas acústicas, que son propagadas por la sonda en el líquido en contacto con ella. En particular, las ondas acústicas son ondas de compresión-descompresión que, cuando se propagan en un líquido a altas intensidades, generan ciclos alternativos de alta y baja presión. Durante el ciclo de baja presión, el líquido alcanza la presión de vapor, creando pequeñas burbujas. Durante la fase de alta presión, las burbujas ya no pueden mantener el equilibrio entre la presión y las fuerzas de viscosidad e implosionan violentamente. La implosión violenta de éstas puede alterar las paredes de las partículas del sustrato cercano, lo que podría liberar materia intercelular que luego puede ser degradada más fácilmente por los microorganismos durante la AD. La cavitación es, por tanto, el fenómeno que subyace a la ultrasonificación y siempre va acompañada de un intenso calentamiento local, que en algunos casos puede alcanzar hasta 5000 K (Figura 1.13).

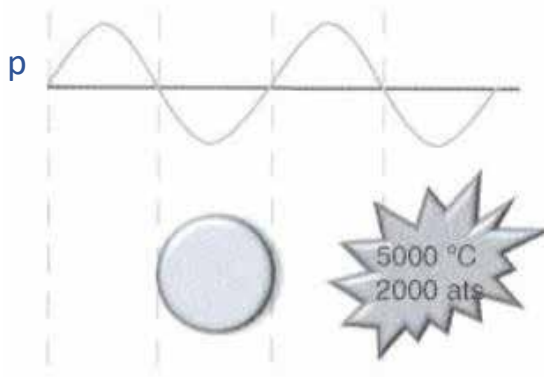


Figura 1.13: Fenómeno de cavitación [26].

El equipo de ultrasonidos está formado por cuatro componentes: generador, convertidor (o transductor), amplificador y sonda (o bocina o sonotrodo) (Figura 1.14).



Figura 1.14: Equipo de ultrasonidos [27].

El generador transforma la potencia de la línea de CA en energía eléctrica de alta frecuencia (20 - 100 kHz), que se recibe del convertidor y se transforma en vibración (la energía eléctrica se convierte en energía mecánica), gracias al material piezoeléctrico del que está hecho el convertidor. El amplificador aumenta la amplitud de las ondas y la sonda propaga finalmente

las ondas acústicas en el medio. Varios estudios han demostrado que la tasa de degradación bacteriana puede acelerarse hasta 4 veces en comparación con el tratamiento convencional [28].

También es posible la sonicación continua de una corriente de entrada (Figura 1.15). La muestra líquida se bombea a la cámara del sonicador a través de la entrada situada en la parte inferior de la unidad. Mientras pasa, la muestra se somete a sonicación. El líquido procesado sale de la unidad por un puerto de salida. Los parámetros de sonicación y el caudal pueden ajustarse. Dado que la sonicación genera calor, se dispone de una camisa de agua para proteger la muestra del sobrecalentamiento. La camisa de agua rodea la cámara y en su interior se recircula agua fría; así, la cámara se enfría desde la superficie exterior.

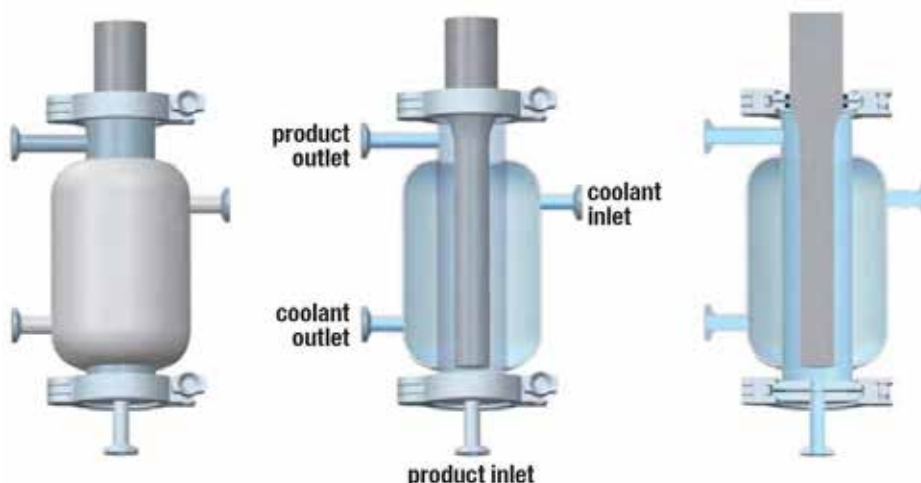


Figura 1.15: Sonicación continua [29].

1.4.2 Térmico

Es uno de los más aplicados a escala industrial para la AD de diversos sustratos. El intervalo de temperaturas va de 50 a 250 °C, ya que se ha observado solubilización de lodos a temperaturas tan bajas como 50 °C [30]. El tiempo de retención aumenta claramente con la disminución de la temperatura, ya que la cinética de cualquier reacción se ve favorecida por la temperatura. El tiempo de retención notificado varía entre 0 minutos y 72 horas [31]. El pretratamiento térmico elimina patógenos, mejora la deshidratación y reduce la viscosidad del digestato, pero pueden formarse compuestos inhibidores, especialmente para largos tiempos de tratamiento térmico. En este sentido, uno de los fenómenos más conocidos es la reacción de Mallaird entre carbohidratos y aminoácidos. Se produce a valores de temperatura superiores a 150°C o a temperaturas inferiores (<100°C) durante un tiempo más prolongado y da lugar a la formación de sustratos complejos difíciles de biodegradar [30]. El efecto del tratamiento depende de

todos modos del tipo de sustrato y del intervalo de temperatura [30]. Por último, aunque el pretratamiento térmico requiere una gran cantidad de energía, los requisitos energéticos durante la fase de pretratamiento pueden ser cubiertos por la producción extra de metano con un retorno neto positivo [32].

1.4.3 Métodos de pretratamiento químico

Los pretratamientos químicos consisten en la adición de sustancias químicas, como álcalis, ácidos fuertes u oxidantes, para lograr la destrucción de los compuestos orgánicos, mejorar la velocidad de hidrólisis y aumentar la producción de biogás. La AD requiere generalmente un ajuste del pH hacia una mayor alcalinidad, por lo que el pretratamiento con álcalis es el método químico preferido [33].

Los pretratamientos químicos no son adecuados para sustratos fácilmente biodegradables, debido a su degradación acelerada y a la consiguiente acumulación de AGV [34]. Por el contrario, el efecto es claramente positivo en sustratos ricos en lignina [35].

1.4.3.1 Pretratamiento alcalino

El tratamiento alcalino provoca altos valores de pH en el sustrato. Es importante subrayar que una concentración elevada de sales puede provocar la deshidratación de las células bacterianas debido a la presión osmótica [36]. Además, los iones de metales ligeros (como el sodio) son necesarios para el crecimiento microbiano y, en consecuencia, afectan a la tasa de crecimiento específica. Mientras que las concentraciones moderadas estimulan el crecimiento microbiano, las cantidades excesivas ralentizan el crecimiento, e incluso las concentraciones más altas pueden causar una inhibición grave o toxicidad [36]. Este pretratamiento puede ser útil para sustratos ácidos y ricos en lignina que, de otro modo, no podrían digerirse anaeróbicamente [20]. Alrededor del 55% de la materia seca puede descomponerse, especialmente cuando se utiliza NaOH para saponificar [37]. Pueden utilizarse otros productos químicos, como cal o amoníaco, pero los elevados costes de los álcalis en general hacen que esta tecnología sea poco atractiva desde el punto de vista económico (Tabla 1.5).

Tabla 1.5: GER de algunos álcalis (Base de datos SimaPro).

Química	GER (MJ/Kg)
Soda, polvo	5,99
Amoníaco líquido	43,6
Amoníaco, oxidación parcial, líquido	49,5
Amoníaco, reformado al vapor, líquido	41,8

1.4.3.2 Pretratamiento ácido

El tratamiento ácido es el método de pretratamiento convencional más utilizado para las materias primas lignocelulósicas a escala industrial [38], aunque la naturaleza corrosiva y tóxica de la mayoría de los ácidos requiere un material adecuado para construir el reactor [39]. El pretratamiento con ácidos se puede utilizar en combinación con calor, pero a temperaturas elevadas de 60°C a 160°C (las temperaturas superiores a 160°C en combinación con ácidos muestran un descenso en la producción de metano) [20], lo que hace que el proceso ya no sea energéticamente sostenible.

1.4.3.3 Pretratamiento oxidativo

El pretratamiento oxidativo se basa en el uso de radicales. Los radicales se forman durante la reacción de oxidación, es decir, la reducción del agente oxidante, como el oxígeno, el ozono (O₃) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Mediante el uso de ozono, el sustrato puede volverse permeable y las macromoléculas insolubles en agua pueden descomponerse en moléculas más pequeñas solubles en agua.

Las desventajas incluyen la formación de sustancias tóxicas para los metanógenos (por ejemplo, formaldehído) y el aumento de la cantidad de carbono libre, que no puede degradarse durante la AD.

Tabla 1.6: GER de algunos oxidantes (Base de datos SimaPro).

Química	GER (MJ/Kg)
Ozono líquido	174
Peróxido de hidrógeno, 50% en H ₂ O	23,8

1.4.4 Métodos biológicos de pretratamiento

1.4.4.1 TSAD

También llamada preacidificación, digestión en dos etapas o fermentación oscura acoplada a un reactor metanogénico, consiste en separar las dos primeras etapas del proceso (*hidrólisis* y *acidogénesis*) de las dos segundas (*acetogénesis* y *metanogénesis*). El valor del pH en el primer digestor se sitúa entre 4 y 6, lo que inhibe la producción de metano (que se produce a valores de pH superiores a 6,5) y provoca una acumulación de ácidos grasos volátiles, pero las enzimas responsables de la degradación de la celulosa, la hemicelulosa y el almidón funcionan muy bien en estas condiciones. En el primer digestor también se forma CO₂, que a pH bajo se libera en el gas producido en la etapa de preacidificación. Por lo tanto, en la etapa siguiente la concentración de metano es mayor.

1.4.4.2 Método de pretratamiento enzimático

Se añade una mezcla de enzimas distintas de las ya presentes (producidas por los microorganismos de la DA). La adición puede producirse en el digestor en el que tiene lugar la DA, en el primer paso de un proceso de DA en dos fases (véase el capítulo 1.3.4.) o en un recipiente específico para el pretratamiento enzimático. Existen indicios de que las enzimas añadidas directamente al reactor de biogás se degradan rápidamente tras su adición [20]. Varios estudios de AD por lotes han indicado que la adición de enzimas a la primera etapa de un proceso de AD de dos etapas conduce a una solubilización del sustrato ligeramente superior y a mayores rendimientos de biogás [20]. La mezcla de enzimas puede incluir diferentes tipos capaces de degradar específicamente: celulosa, hemicelulosa, pectina y almidón.

1.4.5 Tensión de cizallamiento inducida en bacterias

Los pretratamientos pueden afectar no sólo al sustrato, sino también a los microorganismos de la AD en el caso de los procesos de AD húmeda, en los que la materia prima fresca se mezcla con agua. En este caso, la deshidratación es la primera etapa del tratamiento posterior a la digestión; la fracción sólida deshidratada se destina a abono y el agua se recicla para abastecer la planta. En este caso, los microorganismos de la AD se tratan junto con el sustrato. Evidentemente, el efecto deseado para el sustrato (su rotura) no es deseable tampoco para los microorganismos, que no deben resultar dañados para poder impulsar las distintas fases del proceso de AD. El dominio (véase la figura 1.3) y la evolución experimentada por el tipo específico de microorganismo determinan la facilidad con la que los microorganismos de AD pueden romperse.

La célula bacteriana Gram-positiva está contenida en una membrana celular, que sigue rodeada por la pared celular. La función de la membrana no es proteger a la célula del choque osmótico, sino que es más bien elástica, interactiva y semipermeable, ya que está formada principalmente por fosfolípidos y proteínas. Aquí, los gradientes de concentración se mantienen activamente a través de sistemas de transporte, como la cadena de transporte de electrones para producir ATP. Entre la membrana celular y la pared celular se encuentra un espacio periplásmico. La pared celular es fina y rígida; está formada por peptidoglicano, que da estructura a la envoltura celular. Su resistencia se debe a su naturaleza de enlace químico. La capa de peptidoglicano está compuesta por residuos de N-acetil-glucosamina y N-acetil-ácido murámico unidos por enlaces β -(1-4)-glucosídicos. Las cadenas están reticuladas por un tetrapéptido a través del residuo NAM. Los péptidos se entrecruzan aún más, y el resultado es una estructura rígida estricta, que proporciona forma, resistencia a la tracción y protección contra el choque osmótico. Las bacterias Gram-positivas, como *Bacillus*, poseen una gruesa pared celular compuesta por un 50-80% de peptidoglicano junto con ácido teicoico. En cambio, las bacterias Gram negativas tienen una pared celular relativamente fina, compuesta por unas pocas capas de peptidoglicano (aunque éste es el principal responsable de la resistencia celular), pero rodeada por una segunda membrana bicapa lipídico-proteica, que comprende proteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos. Los Firmicutes, como los Clostridios y los Bacilos (véase el capítulo 1.2), y las Actinobacterias se clasifican como bacterias Gram-positivas.

Las bacterias formadoras de metano, clasificadas en el dominio Archaea (véase la Figura 1.3, Capítulo 1), presentan una pared celular diferente. La pared celular carece de ácido murámico y la membrana celular no contiene un lípido éster como constituyente principal [7] (Figura 1.16).

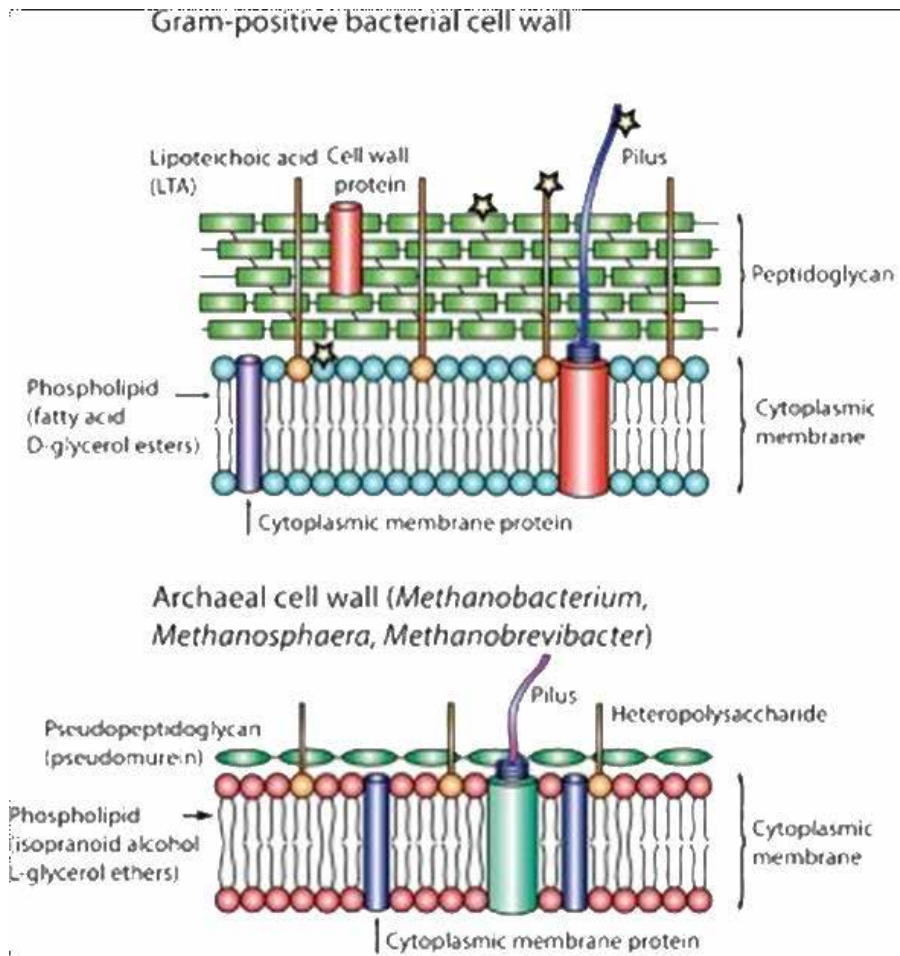


Figura 1.16: Comparación entre la pared celular de las bacterias y la pared celular de los metanógenos [40].

Es posible concluir que los metanógenos se verán más afectados por las tensiones de cizallamiento, debido a la constitución tanto de la membrana celular como de la pared celular, que carecen de ciertos componentes responsables de la fuerza y la resistencia, que, por el contrario, se encuentran en la composición de la membrana y la pared de las células bacterianas Gram-positivas.

1.5 Reflexión láser *in situ*

El método óptico FBRM (método de reflectancia de haz concentrado) se basa en la detección de la luz láser retrodispersada y el tiempo de vuelo (TOF) del haz. Sin embargo, sólo pueden analizarse eficazmente las partículas de forma alargada y no las de forma esférica (bacterias).

Conviene centrarse ahora en una sonda del método de reflectancia óptica tridimensional (3D-ORM) de Sequip S+E GmbH. Está equipada con un haz de excitación que puede moverse en tres dimensiones, lo que abre las puertas al análisis de bacterias esféricas. Además, la sonda es termoesterilizable (las piezas electrónicas internas pueden desmontarse con este fin) y puede utilizarse para mediciones *in situ*. Además, devuelve información sobre la distribución del tamaño celular. A continuación se describen brevemente los componentes de la sonda (figura 1.17).

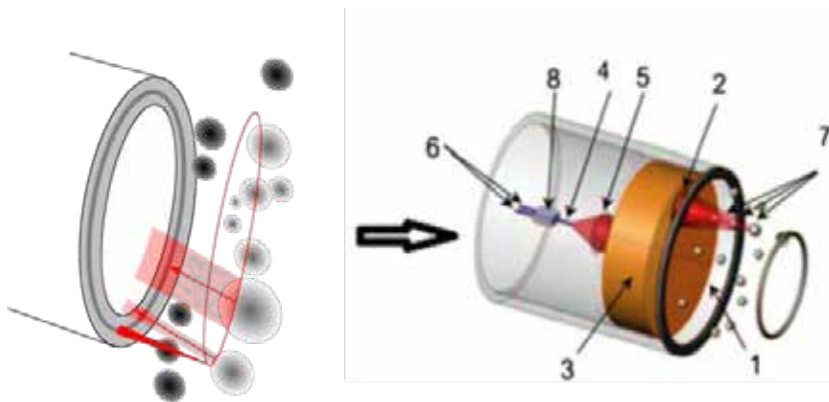


Figura 1.17: Representación esquemática de la sonda Sequip [41]. Una longitud de enfoque altamente eficiente

(2) permite escanear con precisión las células microbianas, que entran en los múltiples planos focales que rodean la sonda. El haz láser tiene una intensidad inferior a 5 mW. La entrada del haz láser en la sonda se realiza mediante una fibra monomodo de 12,8 μm (6). La separación de las señales entrantes y salientes se realiza con un acoplador de fibra óptica (8). Gracias al sistema óptico giratorio (3) y al enfoque dinámico (7), se obtiene la imagen de una trayectoria en espiral con un diámetro de 8,5 mm. El acoplamiento de las señales reflejadas de la sonda se realiza con la fibra monomodo entrante (6). La pequeña sección transversal de dicha fibra (4) garantiza que sólo se detecten partículas directamente o cerca del punto focal.

1.6 Distribución de probabilidades

Una distribución de probabilidad es un modelo matemático que relaciona los valores de una variable con la probabilidad de que dichos valores puedan observarse. Las distribuciones de probabilidad se utilizan para modelizar el comportamiento de un fenómeno de interés en relación con la cantidad total de casos en los que el experimentador observa una muestra determinada. La variable de interés se considera una variable aleatoria cuya ley de probabilidad expresa el grado de incertidumbre con que puede observarse su valor. Además, en las distribuciones continuas la variable se expresa en una escala continua.

Las distribuciones de probabilidad se expresan mediante una ley matemática denominada funciones de densidad de probabilidad (FDP). Las funciones de densidad de probabilidad de interés para este trabajo son las siguientes.

- La distribución normal, donde la *media* **a** y la *varianza* **b²** (o desviación típica **b**) de una variable aleatoria (x) son los parámetros de mayor interés, ya que expresan respectivamente la tendencia central y la variabilidad de la variable aleatoria.

(1.5)

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}b} e^{-\frac{(x-a)^2}{2b^2}}$$

- La distribución de Cauchy

(1.6)

$$y = \frac{1}{\pi b \left(1 + \left(\frac{x-a}{b}\right)^2\right)}$$

- La distribución Gamma

(1.7)

$$y = \frac{1}{b^a \Gamma(a)} x^{a-1} e^{-\frac{x}{b}}$$

- La distribución logística

(1.8)

$$y = \frac{1}{b} \left(e^{\frac{x-a}{2b}} + e^{-\frac{x-a}{2b}} \right)^{-2}$$

- La distribución log-normal es la distribución de probabilidad de una variable aleatoria cuyo logaritmo tiene una distribución normal.

(1.9)

$$y = \frac{1}{x\sqrt{2\pi}b} e^{-\frac{(\ln x - a)^2}{2b^2}}$$

- La distribución log-logística es la distribución de probabilidad de una variable aleatoria cuyo logaritmo tiene una distribución logística.

(1.10)

$$y = \frac{\frac{b}{a} \left(\frac{x}{a}\right)^{b-1}}{\left(1 + \left(\frac{x}{a}\right)^b\right)^2}$$