



universidad  
de león

*Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad*

*Área de Ingeniería Química*

# **OBTENCIÓN DE BIOGÁS E HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO**

**Biogas and hydrogen production from cheese whey**

**Camino Fernández Rodríguez**





universidad  
de león

*Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad*

*Área de Ingeniería Química*

**TESIS DOCTORAL**

**OBTENCIÓN DE BIOGÁS E HIDRÓGENO  
A PARTIR DE LACTOSUERO**

**Biogas and hydrogen production from cheese whey**

Presentada por Camino Fernández Rodríguez para optar al grado de Doctor

Dirigida por la Dra. Xiomar Arleth Gómez Barrios

León, Junio 2014



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría mostrar mi agradecimiento a la directora de esta tesis, Xiomar Gómez, por la confianza depositada en mí, por su paciencia, continuo apoyo y ayuda durante todos estos años. Igualmente, debo expresar mi agradecimiento a Antonio Morán por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación, por su cercanía y familiaridad, cualidades con las que consigue que el ambiente del grupo sea muy agradable. Es realmente difícil expresar en pocas palabras el agradecimiento que siento hacia ellos, así como la admiración por su incansable labor investigadora, siempre pensando y buscando nuevos retos.

También quiero mostrar mi agradecimiento a Nidal Hilal y a los miembros de su grupo de la Universidad de Swansea por la buena acogida que me ofrecieron durante los tres meses que colaboré con ellos.

Me gustaría agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación recibida mediante el programa de ayudas predoctorales FPI.

A continuación me gustaría mostrar el agradecimiento a mis compañeros del IRENA, con los que he compartido tantísimos buenos momentos. Parece que fue ayer la primera vez que entré en el laboratorio de la planta piloto o bajé a la nave. Álvaro, M<sup>a</sup> José, Israel y Vanesa son algunas de las personas con las que empecé a trabajar en la línea de digestión. Un poco más tarde llegaron David, Julio y Judith con los que he trabajado mano a mano tantas y tantas horas en los laboratorios, o Begoña y Rubén M. que me ha ayudado especialmente con la parte de microbiología. Gracias también a todos los estudiantes y becarios que me han echado una mano en los ensayos, en especial al biotecnólogo David. Entre tantas personas no puedo olvidarme de Nuria, cuya ayuda ha sido imprescindible en la realización de los ensayos y las analíticas o de Daní por su experiencia en digestión, siempre dispuesto a echarme una mano. Gracias también por su contribución al resto de compañeros Natalia, Quille, Adri, Diego, Laura, Rubén G, Isa, Raúl, Rebeca, Raquel, Carla, Iris y Marcía.

Quisiera también extender mi agradecimiento al personal del departamento, Marta Elena, Olegario, Jorge, Ana y Luisfer, así como a Juan y Fernando C que me han ayudado a resolver los caprichosos problemas técnicos de los reactores.

Me gustaría mencionar a mis amigas Alba y Car, por estar ahí cuando las he necesitado y a las "Ladies IQ": Esther, Alba, Noemí y Cris, que a pesar de que no nos veamos tan a menudo como nos gustaría, siempre me han transmitido su ánimo

Róber, muchas gracias por estar ahí y confiar en mí. Gracias por todos tus ánimos y paciencia, especialmente estos últimos meses. Me alegro muchísimo de que dentro de poco tú también puedas escribir este capítulo.

Gracias a mis padres, mi hermana y mi abuela, que han estado siempre pendientes de mis avances, ofreciéndome su apoyo incondicional y recordándome lo importante que es tener confianza y caminar hacia delante por muy complicadas que parezcan las cosas.

Por último me gustaría recordar especialmente a mi suegro, el Doctor López, una de las personas que me animó a que siguiera formándome y a que realizara esta tesis. Espero que allí desde donde estés puedas ver que finalmente lo voy a conseguir.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
NOMENCLATURA .....	XII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. LA INDUSTRIA ALIMENTARIA Y EL SECTOR LÁCTEO.....	3
1.1.1. Información general.....	3
1.1.2. Datos de producción .....	3
1.2. SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA QUESERA Y FORMAS DE APROVECHAMIENTO.....	<b>6</b>
1.2.1. Lactosuero.....	6
1.2.2. Variedades de lactosuero y composición .....	7
1.2.3. Problemática medioambiental .....	8
1.2.4. Aplicaciones del lactosuero .....	8
1.3. SECTOR ENERGÉTICO EN ESPAÑA.....	11
1.3.1. Situación actual.....	11
1.3.2. Generación eléctrica.....	13
1.3.3. Energías renovables.....	14
1.3.3.1. Sector del biogás .....	14
1.4. BIBLIOGRAFÍA.....	16
<b>Capítulo 2. Antecedentes y objetivos .....</b>	<b>21</b>
2.1. DIGESTIÓN ANAEROBIA .....	23
2.1.1. Etapas de la digestión anaerobia.....	24
2.1.2. Parámetros que influyen en el proceso de digestión anaerobia .....	26
2.1.2.1. Temperatura .....	26
2.1.2.2. pH.....	27
2.1.2.3. Composición del sustrato .....	27
2.1.2.4. Nutrientes .....	28
2.1.3. Tóxicos e inhibidores .....	30
2.1.3.1. Nitrógeno amoniacal .....	30
2.1.3.2. Ácidos grasos volátiles.....	31
2.1.3.3. Ácidos grasos de cadena larga.....	31

2.1.3.4. Sulfuro .....	32
2.1.3.5. Metales .....	32
2.1.3.6. Metales pesados.....	33
2.1.4. <i>Experiencias de la digestión anaerobia para el tratamiento de lactosuero</i> .....	33
2.1.4.1 Digestión anaerobia.....	33
2.1.4.2 Co-digestión anaerobia.....	37
2.2. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO. FERMENTACIÓN OSCURA .....	37
2.2.2. <i>Factores de influencia en la fermentación oscura</i> .....	40
2.2.2.1. Inóculo.....	40
2.2.2.2. pH.....	40
2.2.2.3. Temperatura .....	41
2.2.2.4. Presión parcial de H <sub>2</sub> .....	41
2.2.2.5. Nutrientes .....	42
2.4.2. <i>Producción de hidrógeno a partir de lactosuero</i> .....	42
2.4.3. <i>Sistemas de dos etapas</i> .....	43
2.5. OBJETIVOS Y PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	47
2.5.1. <i>Objetivo general</i> .....	47
2.5.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	47
2.5.3. <i>Línea de actuación del trabajo experimental</i> .....	48
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	50
<b>Capítulo 3. Material y métodos</b> .....	61
3.1. SUSTRATOS EMPLEADOS .....	63
3.1.1. <i>Inóculo</i> .....	63
3.1.2. <i>Lactosuero</i> .....	65
3.2. ENSAYOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN DISCONTINUO.....	65
3.3. ENSAYOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN RÉGIMEN SEMI-CONTINUO .....	66
3.3.1. <i>Banco de reactores de vidrio</i> .....	66
3.3.2. <i>Planta piloto</i> .....	67
3.3.3. <i>Reactor tubular tipo empaquetado</i> .....	69
3.3.4. <i>Unidad de membrana</i> .....	69
3.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	70
3.4.1. <i>Nitrógeno total</i> .....	70
3.4.2. <i>Materia orgánica</i> .....	71
3.4.3. <i>pH</i> .....	71
3.4.4. <i>Sólidos totales y sólidos volátiles</i> .....	71
3.4.5. <i>Demanda química de oxígeno (DQO)</i> .....	72



3.4.6. <i>Amonio</i> .....	72
3.4.7. <i>Alcalinidad</i> .....	72
3.4.8. <i>Cromatografía de gases</i> .....	72
3.4.8.1. <i>Composición del gas</i> .....	73
3.4.8.2. <i>Ácidos grasos volátiles</i> .....	73
3.4.8.3. <i>Alcoholes</i> .....	73
3.4.9. <i>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i> .....	74
3.4.10. <i>Análisis microbiológico</i> .....	74
3.4.11. <i>FTIR</i> .....	77
3.4.12. <i><sup>1</sup>H NMR</i> .....	78
3.5. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	78
<b><i>Capítulo 4. Mesophilic anaerobic digestion of cheese whey by anaerobic sequencing batch reactor. Coupling a membrane unit for effluent treatment</i></b> .....	81
Abstract .....	83
4.1. <b>INTRODUCTION</b> .....	84
4.2. <b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	85
4.2.1. <i>Substrate and Inoculum</i> .....	85
4.2.2. <i>Batch Experiments</i> .....	86
4.2.3. <i>Kinetic Model Adjustment</i> .....	87
4.2.4. <i>Experimental Set-up</i> .....	88
4.2.5. <i>Membrane Unit</i> .....	89
4.2.6. <i>Analytical Techniques</i> .....	90
4.3. <b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	91
4.3.1. <i>Batch Experiments</i> .....	91
4.3.2. <i>Performance of the CSTR</i> .....	93
4.3.3. <i>Performance of the SBR</i> .....	95
4.4. <b>CONCLUSIONS</b> .....	99
4.5. <b>REFERENCES</b> .....	99
<b><i>Capítulo 5. Influence of natural organic matter during tubular microfiltration ceramic membranes operation</i></b> .....	103
Abstract .....	105
5.1. <b>INTRODUCTION</b> .....	106
5.1.1. <i>Membrane technology</i> .....	106
5.1.2. <i>Ceramic membranes</i> .....	107
5.1.3. <i>Fouling</i> .....	108
5.2. <b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	110

5.2.1. Testing solutions.....	110
5.2.2. Membranes.....	110
5.2.3. Analytical techniques .....	111
5.2.4. Calculations .....	112
5.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	114
5.3.1. Effect of humic acid (HA) retention .....	114
5.3.2. Effect of salinity.....	117
5.3.3. Effect of salinity and heavy metals .....	118
5.4. CONCLUSIONS.....	120
5.5. REFERENCES.....	121
<b>Capítulo 6. Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: effect of organic loading rate .....</b>	<b>123</b>
Abstract .....	125
6.1. INTRODUCTION.....	126
6.2. MATERIALS AND METHODS .....	127
6.2.1. Substrates and inoculum .....	127
6.2.2. Erlenmeyers tests.....	128
6.2.3. Tubular packed bed reactor .....	129
6.2.4. Analytical techniques .....	131
6.2.5. Microbial community analysis .....	131
6.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	132
6.3.1 Batch fermentation .....	132
6.3.2 Erlenmeyers tests.....	133
6.3.3 Tubular packed bed reactor: Synthetic wastewater .....	134
6.3.4 Tubular packed bed reactor: Cheese whey permeate .....	136
6.4. CONCLUSIONS.....	140
6.5. REFERENCES.....	141
<b>Capítulo 7. Thermophilic digestion of cheese whey: coupling H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production.....</b>	<b>145</b>
Abstract .....	147
7.1. INTRODUCTION.....	148
7.2. MATERIALS AND METHODS .....	149
7.2.1. Substrates and inoculum .....	149
7.2.2. Experimental setup.....	150
7.2.3. Operating conditions.....	151
7.2.4. Analytical techniques .....	152

7.2.5. FTIR spectroscopy.....	153
7.2.6. <sup>1</sup> H NMR spectroscopy .....	153
7.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	154
7.3.1 Single stage anaerobic digestion of cheese whey.....	155
7.3.2 Two-stages anaerobic digestion.....	157
7.3.2.1. Operation of H <sub>2</sub> producing reactor .....	157
7.3.2.2. Digestion as second stage.....	160
7.3.3. FTIR analysis .....	163
7.3.4. <sup>1</sup> HNMR Analysis.....	165
7.4. CONCLUSIONS.....	166
7.5. REFERENCES.....	167
<b>Capítulo 8. Anaerobic co-digestion of sewage sludge with cheese whey under thermophilic and mesophilic conditions .....</b>	<b>173</b>
Abstract .....	175
8.1. INTRODUCTION.....	176
8.2. MATERIALS AND METHODS .....	178
8.2.1. Substrate and inoculum .....	178
8.2.2. Batch digestion experiments.....	179
8.2.3. Kinetic analysis .....	179
8.2.4. Analytical techniques .....	180
8.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	181
8.3.1. Batch experiments of SS .....	181
8.3.2. Batch experiments of CW .....	183
8.3.3. Batch experiments of co-digestion .....	184
8.4. CONCLUSIONS.....	186
8.5. REFERENCES.....	186
<b>Capítulo 9. Conclusiones generales .....</b>	<b>191</b>
CONCLUSIONES .....	193
CONCLUSIONS.....	196

# ÍNDICE DE FIGURAS

## Capítulo 1. Introducción

<b>Figura 1.1.</b> Distribución de la producción anual y destino de leche. a) Datos de Europa (EUROSTAT, 2013) b) Datos de España (MAGRAMA, 2012b) .....	4
<b>Figura 1.2.</b> Distribución mundial de la producción de queso datos del año 2011 (FAOSTAT, 2012) .....	5
<b>Figura 1.3.</b> Mapa de potencial de producción disponible de lactosuero (PROBIOGAS, 2010) .....	6
<b>Figura 1.4.</b> Consumo de energía primaria en España año 2012. Distribución por fuentes energéticas (MINETUR, 2014).....	12
<b>Figura 1.5.</b> Evolución de la producción interior de energía por fuentes energéticas (MINETUR, 2011).....	12
<b>Figura 1.6.</b> Evolución de la generación de electricidad a partir de diferentes tipos de energía (MINETUR, 2011).....	13
<b>Figura 1.7.</b> Estructura de la generación eléctrica en España año 2012 (MINETUR, 2014). 14	

## Capítulo 2. Antecedentes y Objetivos

<b>Figura 2.1.</b> Esquema del proceso de digestión anaerobia (Massé y Droste, 2000).....	25
<b>Figura 2.2.</b> Influencia del contenido de celulosa y lignina sobre la biodegradabilidad de varios residuos orgánicos. Residuos sólidos urbanos (RSU) (Buffiere et al., 2006). .....	28
<b>Figura 2.3.</b> Reacciones del metabolismo de la glucosa. 1. Fermentación de la glucosa a piruvato mediante la ruta Entner-Doudoroff. 2. Decarboxilación oxidativa del piruvato mediante la PFOR. 3. Formación de hidrógeno por acción de la enzima hidrogenasa. 4. Fermentación butírica. (Angenent et al., 2004).....	39
<b>Figura 2.4.</b> Esquema general del trabajo.....	49

## Capítulo 3. Material y métodos

<b>Figura 3.1.</b> a) Lodo digerido EDAR, b) Pellets de biosólido .....	64
<b>Figura 3.2.</b> a) Permeado de ultrafiltración b) Diferentes muestras de lactosuero pruebas co-digestión.....	65
<b>Figura 3.3.</b> a) Imagen de los reactores del montaje de ensayos en discontinuo.....	66
<b>Figura 3.4.</b> Banco de reactores de vidrio.....	67
<b>Figura 3.5.</b> Planta piloto.....	69

<b>Figura 3.6. Unidad de membrana</b> .....	70
<b>Figura 3.7. Imagen de un gel de agarosa</b> .....	76
<b>Figura 3.8. Equipo DGGE e imagen de un gel obtenido tras la DGGE</b> .....	76

**Capítulo 4. Mesophilic anaerobic digestion of cheese whey by anaerobic sequencing batch reactor. Coupling a membrane unit for effluent treatment**

<b>Figure 4.1. Reactor scheme. a) CSTR configuration, b) SBR configuration, c) SBR coupled with a membrane unit</b> .....	88
<b>Figure 4.2. Experimental biogas production data and VFAs at different CW concentration, Initial concentration of CW a), b) CW 6.2 g VS/L, c), d) CW 12.4 g VS/L and e), f) CW 18.6 g VS/L</b> .....	91
<b>Figure 4.3. a) Daily biogas production and OLR applied. b) VFAs content</b> .....	94
<b>Figure 4.4. a) Daily biogas production and OLR applied. b) VFAs content</b> .....	96

**Capítulo 5. Influence of natural organic matter during tubular microfiltration ceramic membranes operation**

<b>Figura 5.1. Membrane operation (Soni et al., 2009)</b> .....	106
<b>Figure 5.2. A) Cake formation; B) Intermediate blocking; C) standard blocking; D) total blocking (Blankert, et al., 2006).</b> .....	109
<b>Figure 5.3. Schematic structure of HA molecule (Sutzkover et al., 2010)</b> .....	109
<b>Figure 5.4. Membrane unit and ceramic tubular membrane detail</b> .....	111
<b>Figure 5.5. Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 1.5 L/min. HA concentration of 10 mg/L (a; b) and 30 mg/L (c; d)</b> .....	114
<b>Figure 5.6. Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 2 L/min. HA concentration of 10 mg/L (a,b) and 30 mg/L (c,d).</b> .....	115
<b>Figure 5.7. HA retention observed during experiments</b> .....	116
<b>Figure 5.8. Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 1.5 L/min. Concentration HA 10 mg/L; NaCl 25 g/L (a, b) and HA 30 mg /L; NaCl 25 g/L (c, d)</b> .....	117
<b>Figure 5.9. Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 2 L/min. Concentration HA 10 mg/L; NaCl 25 g/L (a, b) and HA 30 mg /L;NaCl 25 g/L (c, d)</b> .....	118
<b>Figure 5.10. Feed solution and permeate samples after membrane operation</b> .....	119
<b>Figure 5.11. Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 1.5 L/min. Concentration HA 10 mg/L; NaCl 25 g/L; HM 10 mg/L (a, b) and HA 30 mg /L; NaCl 25 g/L; HM 10 mg/L (c, d)</b> .....	119

<b>Figure 5.12.</b> Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 2 L/min. Concentration HA 10 mg/L; NaCl 25 g/L; HM 10 mg/L (a, b) and HA 30 mg/L; NaCl 25 g/L; HM 10 mg/L (c, d) .....	120
---	-----

**Capítulo 6. Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: effect of organic loading rate**

<b>Figure 6.1.</b> Schematic description of the packed bed reactor for H <sub>2</sub> production .....	129
<b>Figure 6.2.</b> Evolution of biogas and H <sub>2</sub> production during batch fermentation for activating H <sub>2</sub> producing microorganisms. H <sub>2</sub> production (◊), Biogas production (■) .....	133
<b>Figure 6.3.</b> Evolution of biogas production, H <sub>2</sub> production and OLR applied during erlenmeyer flask tests. H <sub>2</sub> production (◊), Biogas production (■), OLR (-) .....	134
<b>Figure 6.4.</b> Biogas production, H <sub>2</sub> production and OLR applied during fermentation experiments in a packed bed reactor employing SW as substrate. H <sub>2</sub> production (◊), Biogas production (■), OLR (-) .....	135
<b>Figure 6.5.</b> Concentration of VFAs during fermentation experiments in a packed bed reactor employing SW as substrate. Acetic acid (x), Propionic acid (Δ), Butyric acid (■) .....	136
<b>Figure 6.6.</b> Biogas production, H <sub>2</sub> production and OLR applied during fermentation experiments in a packed bed reactor employing CWP as substrate. H <sub>2</sub> production (◊), Biogas production (■), OLR (-) .....	137
<b>Figure 6.7.</b> Concentration of VFAs during fermentation experiments employing CWP as substrate. Acetic acid (x), Propionic acid (Δ), Butyric acid (■), Lactic acid (o) .....	138

**Capítulo 7. Thermophilic digestion of cheese whey: coupling H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production**

<b>Figure 7. 1.</b> Schematic description of the plant used for single and two stages anaerobic processes .....	151
<b>Figure 7.2.</b> Anaerobic digestion of cheese whey. Daily biogas production and OLR applied (a); VFAs content (b).....	156
<b>Figure 7.3.</b> H <sub>2</sub> reactor of the two-stage process. Daily biogas production, OLR applied and H <sub>2</sub> content (a); VFAs content (b) .....	158
<b>Figure 7.4.</b> CH <sub>4</sub> reactor of the two-stage process. Daily biogas production and OLR applied (a); VFAs content and alkalinity (b).....	161
<b>Figure 7.5.</b> FTIR spectra of cheese whey, inoculum and digested samples.....	164
<b>Figure 7.6.</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of thermophilic digested samples. Two-stages HRT 25 days (A), Two-stages HRT 16.7 days, Two-stages HRT 12.5 days (C) and single stage HRT 8.3 days (D) .....	166

**Capítulo 8. Anaerobic co-digestion of sewage sludge with cheese whey under thermophilic and mesophilic conditions**

**Figure 8.1.** *CH<sub>4</sub> yield and VFA concentration during batch digestion tests of SS under - (a) mesophilic - (b) thermophilic conditions.....* 182

**Figure 8.2.** *CH<sub>4</sub> yield of the different substrates studied during batch digestion tests. ....* 184

**Figure 8.3.** *CH<sub>4</sub> yield and VFA concentration during batch co-digestion tests of SS and CW under - (a) mesophilic - (b) thermophilic conditions .....* 185

# ÍNDICE DE TABLAS

## **Capítulo 1. Introducción**

<i>Tabla 1.1. Caracterización genérica del lactosuero.....</i>	7
<i>Tabla 1.2. Potenciales de producción de biogás (MINETUR, 2011).....</i>	15

## **Capítulo 2. Antecedentes y objetivos**

<i>Tabla 2.1. Principales ácidos orgánicos generados durante la acidogénesis .....</i>	24
<i>Tabla 2.2. Principales nutrientes requeridos durante la digestión anaerobia (Kayhanian y Rich, 1995). .....</i>	29
<i>Tabla.2.3. Trabajos de digestión anaerobia de lactosuero.....</i>	36
<i>Tabla 2.4. Trabajos de producción de H<sub>2</sub> en régimen discontinuo.....</i>	45
<i>Tabla 2.5. Trabajos de producción de H<sub>2</sub> a partir de lactosuero .....</i>	46

## **Capítulo 3. Material y métodos**

<i>Tabla 3.1. Caracterización de los lodos utilizados como inóculo .....</i>	64
--	----

## **Capítulo 4. Mesophilic anaerobic digestion of cheese whey by anaerobic sequencing batch reactor. Coupling a membrane unit for effluent treatment**

<i>Table 4.1. Characteristics of the substrate and inoculum.....</i>	86
<i>Table 4.2. Kinetic parameters of modified Gompertz model.....</i>	93
<i>Table 4.3. Summary of the main parameters evaluated during SBR experiments.....</i>	98

## **Capítulo 5. Influence of natural organic matter during tubular microfiltration ceramic membranes operation**

<i>Table 5.1. Classification of membranes and membrane processes (Ulbricht,2006).....</i>	107
<i>Table 5.2. Summary of experiments.....</i>	113

## **Capítulo 6. Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: effect of organic loading rate**

<i>Table 6.1. Chemical characteristics of CWP. ....</i>	128
<i>Table 6.2. Operating conditions of packed bed reactor using SW and CWP as substrate ...</i>	130
<i>Table 6.3. Performance of the packed bed reactor during experiments feeding with CWP as substrate .....</i>	138



**Capítulo 7. Thermophilic digestion of cheese whey: coupling H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production**

<i>Table 7.1. Characteristics of the substrate and inoculum.....</i>	154
<i>Table 7.2. Experimental results during the anaerobic digestion of cheese whey .....</i>	157
<i>Table 7.3. Performance of the Hydrogen reactor .....</i>	159
<i>Table 7.4. Performance of the methane reactor.....</i>	163

**Capítulo 8. Anaerobic co-digestion of sewage sludge with cheese whey under thermophilic and mesophilic conditions**

<i>Table 8.1. Characterisation of Substrates and Inoculum.....</i>	178
<i>Table 8.2. Results and parameters estimated from batch digestion tests.....</i>	183

## NOMENCLATURA

<b>AGCL</b>	Ácidos grasos de cadena larga
<b>AGVs</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>ASBR</b>	Anaerobic sequencing batch reactor
<b>COD</b>	Chemical oxygen demand
<b>COD/N</b>	Chemical oxygen demand/Nitrogen ratio
<b>CSTR</b>	Reactor continuo de mezcla completa (Continuous stirring tank reactor)
<b>C/N</b>	Relación carbono nitrógeno
<b>C<sub>p</sub></b>	Permeate concentration
<b>C<sub>b</sub></b>	Bulk solution concentration
<b>CW</b>	Cheese Whey
<b>CWP</b>	Cheese whey permeate
<b>DBO</b>	Demanda biológica de oxígeno
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>EDAR</b>	Estación depuradora de aguas residuales
<b>FID</b>	Detector de ionización de llama (Flame ionization detector)
<b>FORSU</b>	Fracción de residuos sólidos urbanos
<b>FR</b>	Flow rate
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy)
<b>FHP</b>	Dark fermentative H <sub>2</sub> production
<b>GC</b>	Gas chromatograph
<b>HA</b>	Humic acids
<b>HM</b>	Heavy metals
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Resonancia magnética nuclear de protón (Proton nuclear magnetic resonance)
<b>HRT</b>	Hydraulic retention time
<b>HY</b>	Hydrogen yield (L H <sub>2</sub> /kg COD)

<b>I/S</b>	Inoculum/Substrate ratio
<b>ICP-AES</b>	Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer
<b>J</b>	Permeate volume flux
<b>KN</b>	Kjeldahl Nitrogen
<b>MBR</b>	Membrane biological reactor
<b>MF</b>	Microfiltration
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina reducido
<b>NF</b>	Nanofiltration
<b>NOM</b>	Natural organic matter
<b>OLR</b>	Organic loading rate
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
<b>PER</b>	Plan de energías renovables
<b>PFOR</b>	Complejo enzimático piruvato-ferredoxina-óxido-reductasa
<b>P<sub>(t)</sub></b>	Specific biogás production (L/kg VS)
<b>P<sub>max</sub></b>	Maximum specific biogas production (L/kg VS)
<b>P<sub>exp</sub></b>	Experimental production
<b>PUF</b>	Polyurethane foam
<b>R<sup>2</sup></b>	Regression coefficient
<b>R<sub>max</sub></b>	Maximum biogas production rate (L/d)
<b>RO</b>	Reverse Osmosis
<b>Robs</b>	Observed retention
<b>SBR</b>	Sequencing batch reactor
<b>SRT</b>	Solid retention time
<b>SMP</b>	Specific methane production
<b>SS</b>	Sewage sludge
<b>SW</b>	Synthetic wastewater
<b>SV</b>	Sólidos volátiles
<b>ST</b>	Sólidos totales
<b>TCD</b>	Detector de conductividad térmica
<b>TMP</b>	Transmembrane pressure
<b>TRH</b>	Tiempo de retención hidráulica
<b>TS</b>	Total solids

<b>UASB</b>	Reactor de flujo ascendente con lecho de lodos (Upflow anaerobic sludge blanket)
<b>UAF</b>	Filtro anaerobio de flujo ascendente (Upflow anaerobic filter)
<b>UASFF</b>	Up-flow anaerobic sludge fixed film
<b>UF</b>	Ultrafiltration
<b>VFA</b>	Volatile fatty acids
<b>VS</b>	Volatile solids
<b>WWTP</b>	Wastewater treatment plant
$\lambda$	Lag phase duration
$\xi$	Rejection

## RESUMEN

Durante el proceso de elaboración del queso se genera como subproducto una elevada cantidad de lactosuero. Este producto se caracteriza por su elevado contenido en agua y materia orgánica (principalmente lactosa y proteínas) por lo que es necesario su tratamiento para evitar problemas de contaminación o su valorización para la recuperación de los principales compuestos.

La posibilidad de introducir un tratamiento biológico, como la digestión anaerobia se presenta como una opción factible que puede permitir gestionar y valorizar económicamente el lactosuero gracias al aprovechamiento energético del biogás.

En este trabajo se evaluaron diferentes alternativas de tratamiento que incluyeron la digestión para la producción de biogás y la fermentación oscura para la producción de hidrógeno. Igualmente, se propuso la opción de aplicar sistemas de digestión en dos etapas, con producción combinada de hidrógeno y biogás. Finalmente, se planteó la co-digestión de lactosuero con lodos de depuradora como una opción de aumentar el rendimiento de los digestores de las estaciones depuradoras de aguas residuales.

El lactosuero utilizado fue el permeado obtenido del proceso de ultrafiltración del suero bruto. Este tratamiento estaba destinado a la recuperación de proteínas. El permeado obtenido consistía mayoritariamente en un concentrado de lactosa con un reducido contenido en nitrógeno, haciendo necesaria la adición de un suplemento de este nutriente para mantener el desarrollo de la digestión.

Se realizaron pruebas en discontinuo para evaluar el potencial de producción de biogás del lactosuero y pruebas de digestión en régimen semi-continuo en condiciones mesofílicas. Los ensayos realizados en reactores convencionales se caracterizaron por presentar problemas derivados de la rápida acidificación del sustrato, por lo que para lograr una operación estable, fue necesario aplicar bajas cargas orgánicas y altos tiempos de retención hidráulica (TRH). Una vez superado el problema inicial, el TRH se redujo hasta 19,2 días con una producción específica de 177,3 L CH<sub>4</sub>/kg DQO. Ante estos resultados, se optó por la aplicación de reactores con acumulación de biomasa,

para reducir el tiempo de arranque. Esto permitió reducir el TRH hasta 13,9 días y la producción específica alcanzó un valor de 305,4 L CH<sub>4</sub>/kg DQO. En este sistema se evaluó la incorporación de una unidad de membrana para el tratamiento del efluente, haciendo necesario evaluar las limitaciones que pueden presentarse asociadas a problemas de ensuciamiento. Otra opción estudiada que permitió aumentar la capacidad de tratamiento del digestor fue la aplicación del régimen termofílico, que permitió reducir el TRH hasta 8,3 días con una producción de 314,5 L CH<sub>4</sub>/kg DQO.

Adicionalmente se evaluó la producción de hidrógeno obtenida mediante un proceso de fermentación oscura en un reactor empaquetado. Se utilizó como material soporte espuma de poliuretano para favorecer la fijación y crecimiento de los microorganismos. Estas pruebas se caracterizaron por rendimientos de producción de hidrógeno reducidos, 0,34-0,46 mol H<sub>2</sub>/mol lactosa, debido a la presencia de microorganismos no productores de hidrógeno, *Sporolactobacillus sp* y *Prevotella*, que fueron detectados en los análisis microbiológicos.

Posteriormente, se estudió un sistema de digestión anaerobia en dos etapas para la producción combinada de hidrógeno y metano. Durante estas pruebas se aplicaron las técnicas de espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear para evaluar las modificaciones de las estructuras orgánicas en muestras de digerido. Al aplicar un TRH de 25 días en el reactor anaerobio, se obtuvo una mejoría en la producción específica, 349,5 L CH<sub>4</sub>/kg DQO, frente al sistema de digestión en una etapa, 312,4 L CH<sub>4</sub>/kg DQO. Se observó que el contenido en sales del efluente de la etapa de fermentación oscura pudo influir negativamente en la segunda etapa de digestión anaerobia, presentando problemas de inestabilidad al reducirse el TRH hasta 12,5 días.

Por último, se estudió la utilización de lactosuero como co-sustrato en un proceso de digestión de lodos, obteniéndose mejores resultados en régimen mesofílico, 301,2 L CH<sub>4</sub>/kg SV, frente a los termofílicos, 250,6 L CH<sub>4</sub>/kg SV.

## ABSTRACT

Large quantities of cheese whey as by-product are produced in cheese factories. Due to its high water and organic matter content (mainly lactose and proteins) this effluent ought to be recovered for valorisation or should be properly disposed to avoid environmental problems.

Biological treatments such as anaerobic digestion, are an interesting alternative for cheese whey valorisation, since they allow the conversion of a liquid effluent into a fuel as it is biogas.

Different treatment alternatives were evaluated in the present work: anaerobic digestion and dark fermentation, as a means to produce biogas and hydrogen. In this line, the application of a two-stages digestion system was also studied to produce simultaneously hydrogen and methane. Finally, cheese whey was evaluated as a suitable co-substrate in order to be co-digested in the digestion of sewage sludge from waste water treatment plant in an attempt to improve the biogas yield of these reactors.

Cheese whey permeate, obtained after the ultrafiltration membrane treatment intended to recover the protein fraction, was used as substrate. It was mainly composed of lactose with a low nitrogen content, therefore, a nitrogen supplement was needed to obtain steady anaerobic digestion performance.

Firstly, batch experiments under mesophilic conditions were carried out to evaluate biogas specific production of cheese whey. Subsequently, semi-continuous tests, were performed using conventional reactors, resulting in rapid acidification of cheese whey which turned into operation problems. Low organic loading rates (OLR) and long hydraulic retention times (HRTs) were needed to circumvent these problems. Finally HRT was reduced to 19.2 days and a methane yield of 177.3 L CH<sub>4</sub>/kg COD was achieved once steady operation was attained. Accumulation of biomass in the reactor was proposed as an alternative to favour the maintenance of microorganisms in the system and reduce start-up times. Under these conditions, HRT was shortened to 13.9 days and a biogas yield of 305.4 L CH<sub>4</sub>/kg COD was obtained. Moreover, the application of a membrane unit to treat the effluent was suggested, although membrane

fouling limitations should be further evaluated. Another alternative to improve digester performance was to apply thermophilic temperatures. It was possible to reduce HRT to 8.3 days and obtain a methane yield of 314.5 L CH<sub>4</sub>/kg COD.

Furthermore, the production of hydrogen by dark fermentation using a packed bed reactor with polyurethane foam as support material was evaluated. Low hydrogen yields, 0.335-0.463 mol H<sub>2</sub>/mol lactose, were obtained associated to the presence of non H<sub>2</sub> producers, *Sporolactobacillus sp* and *Prevotella*, detected in microbial analysis.

The two-stages system was evaluated using, infrared and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy in order to study changes in organic matter structure of digestates samples. The anaerobic digestion at an HRT of 25 days presented higher methane yield (349.5 L CH<sub>4</sub>/kg COD) than the one stage system (312.4 L CH<sub>4</sub>/kg COD). However, it was observed that the anaerobic digestion stage was negatively affected by the accumulation of salts added during the dark fermentation stage for pH control, thus, the anaerobic reactor presented instabilities at an HRT of 12.5 days.

Finally, experiments testing the co-digestion of cheese whey with sewage sludge, presented higher methane yields when operating under mesophilic conditions (301.2 L CH<sub>4</sub>/kg VS), than those under termophilic conditions (250.6 L CH<sub>4</sub>/kg VS).



# *Capítulo 1*

## *Introducción*



## **1.1. LA INDUSTRIA ALIMENTARIA Y EL SECTOR LÁCTEO**

### ***1.1.1. Información general***

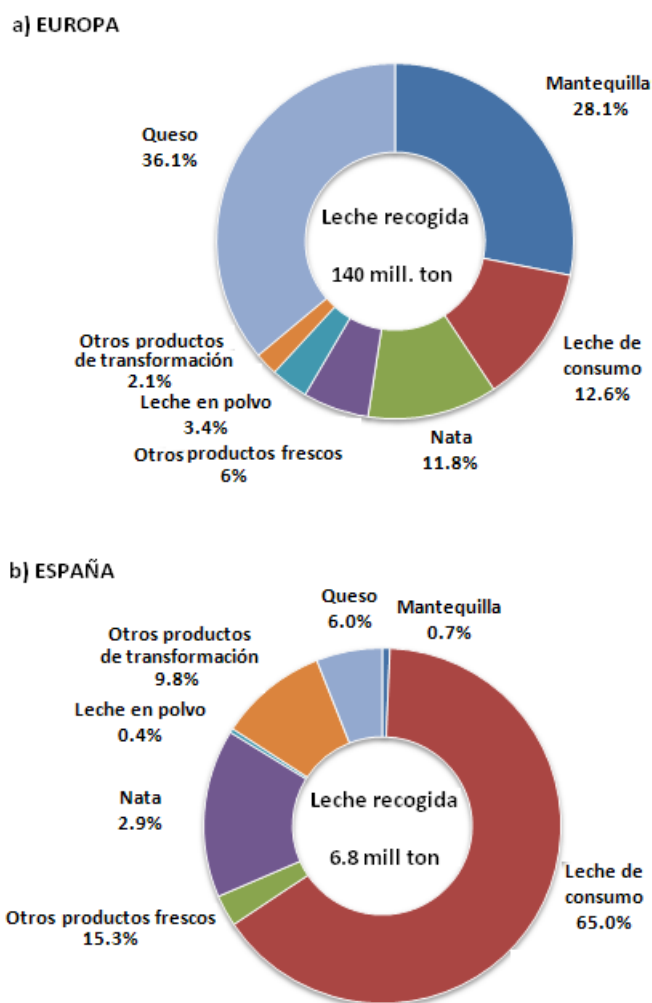
En España, la Industria Alimentaria comprende un 14% de las ventas netas de la industria y un 7,6% del producto interior bruto (PIB) lo que la convierte en el primer sector industrial de la economía y el quinto de Europa. Conforme a datos disponibles del año 2012, el sector está compuesto por casi 30 000 empresas, que ofrecen empleo a 439 675 personas equivalente a un 20% del empleo industrial total (FIAB, 2012).

El sector lácteo abarca la industria alimentaria dedicada a la elaboración de productos procedentes de la leche. Son varios los tipos de industrias y de productos finales que se encuadran dentro de este sector destacando principalmente: la leche de consumo, concentrada, en polvo, nata, mantequilla, el queso, leche acidificada, el yogur, los postres lácteos y helados. En el fichero coordinado de Industrias Alimentarias del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente figura que durante el año 2012, las industrias lácteas procesaron aproximadamente 6,8 millones de toneladas de leche de vaca, oveja y cabra. Sus ventas representaron en torno al 10% del valor de las ventas de la Industria Alimentaria, lo que significa un 2% del total de la Industria española. Comprende 1 395 empresas (MAGRAMA, 2012) y en su actividad se emplean de forma directa más de 32 000 personas constituyendo un sector de gran importancia (FENIL, 2012).

### ***1.1.2. Datos de producción***

Según la información disponible en la base de datos de estadísticas de la FAO, la producción mundial de leche ascendió a 739 millones de toneladas en el año 2011 (FAOSTAT, 2012). En la EU-27 se estimó una recogida total de leche de 140 millones de toneladas (EUROSTAT, 2013).

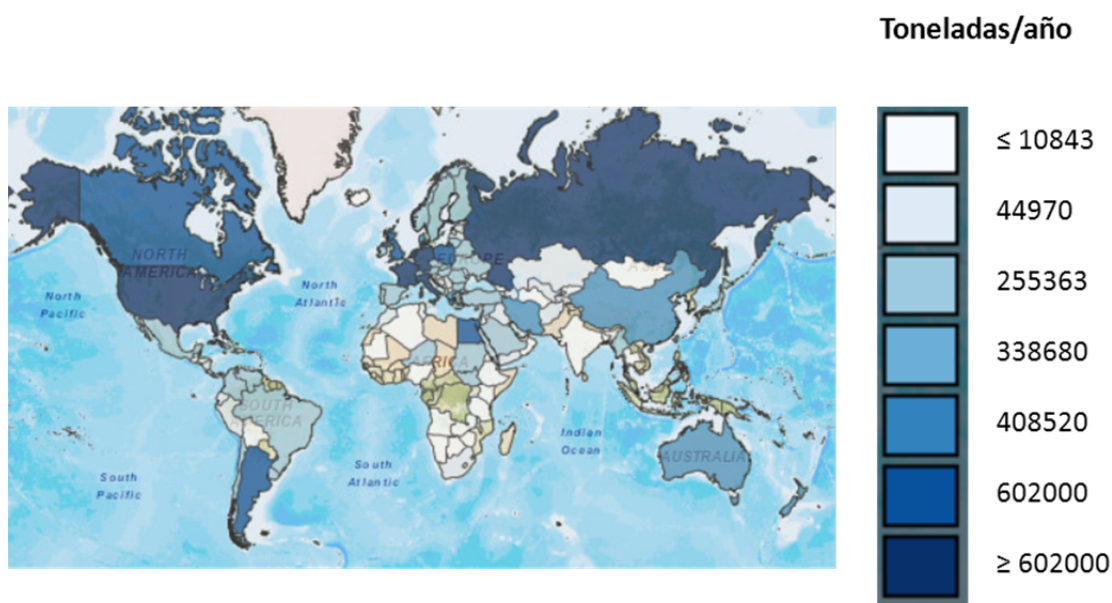
En la Figura 1.1 se representa la distribución del uso de esta leche. Más de un tercio (36,1%) de la leche utilizada fue transformada en queso. La producción de mantequilla alcanzó la segunda proporción más alta (28,1%); mientras que más de una décima parte de la leche se empleó como leche de consumo (el 12,6%) y para la obtención de nata (el 11,8%).



**Figura 1.1.** Distribución de la producción anual y destino de leche. a) Datos de Europa (EUROSTAT, 2013) b) Datos de España (MAGRAMA, 2012b)

Analizando los datos disponibles del año 2012 se puede observar que la distribución de la producción industrial de lácteos en España es muy distinta a la de la UE, ya que se caracteriza por una mayor proporción de leche líquida (65%), seguida por la obtención de otros productos frescos que incluyen la producción de yogures (15,3%). La transformación de la leche para la producción de queso supuso solamente un 6,0% del total.

Respecto a los datos de producción de queso, el valor de producción mundial alcanzó un valor de 20,2 millones de toneladas, de los cuales 8,8 millones de toneladas fueron producidos en la Unión Europea (FAOSTAT, 2012). Los países que registraron las mayores cantidades de leche recogida y mayores niveles de producción de queso fueron: Alemania, Francia e Italia, representando un 24, 22 y 13%, respectivamente (Figura 1.2). Por otra parte, en España en el año 2011, la producción de queso alcanzó un valor de 307 000 toneladas situándose como el séptimo mayor productor en la Unión Europea.

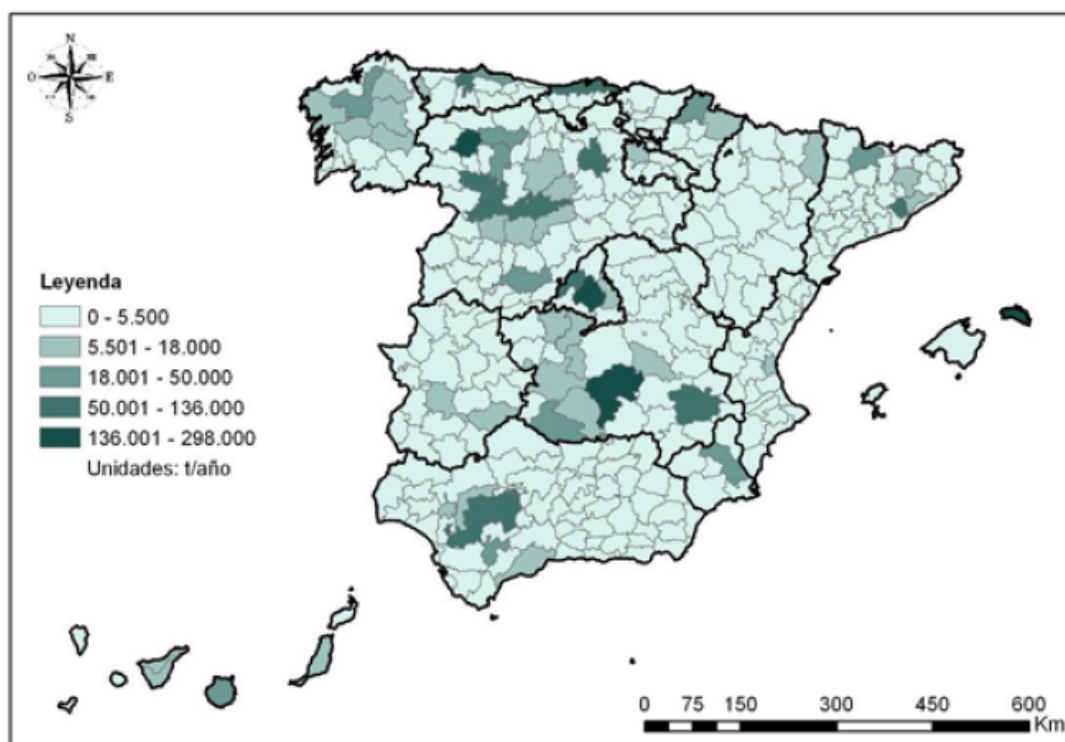


**Figura 1.2.** Distribución mundial de la producción de queso datos del año 2011 (FAOSTAT, 2012)

## 1.2. SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA QUESERA Y FORMAS DE APROVECHAMIENTO

### 1.2.1. Lactosuero

Durante el proceso de elaboración del queso se genera como principal subproducto el lactosuero. Se trata de la fracción líquida de la leche que se obtiene tras la precipitación y recuperación de la caseína. Este subproducto supone aproximadamente un 85-95% del volumen total de la leche empleada y en el se retiene un 55% de los nutrientes (González, 1996). Se estima una producción de lactosuero aproximada de 9 L por cada kg de queso producido (González, 1996). En la Figura 1.3 se representa un mapa de potencial de producción disponible de lactosuero en España, el valor de producción total se situó en un valor de 2 734 763 ton/año (PROBIOGAS, 2010).



*Figura 1.3. Mapa de potencial de producción disponible de lactosuero (PROBIOGAS, 2010)*

### 1.2.2. Variedades de lactosuero y composición

Dependiendo del procedimiento empleado en la precipitación de la caseína se distinguen dos modalidades de lactosuero. El suero dulce, con un pH comprendido entre 6-7 unidades y el cual se obtiene por coagulación enzimática. Por otro lado, el suero ácido se produce por una coagulación tras llevar a cabo una acidificación que origina un producto final con un pH inferior a 5 unidades.

La composición del lactosuero varía en función del tipo de leche utilizada y la variedad de queso elaborado. Generalmente incluye en su composición: agua, lactosa, proteínas del suero (lactoalbúmina y lactoglobulina, principalmente), grasas, minerales, ácido láctico y vitaminas del grupo B. En la Tabla 1.1 figura una composición típica.

*Tabla 1.1. Caracterización genérica del lactosuero (Bylund, 2003)*

Composición (%)		
Componente	Suero ácido	Suero dulce
<b>Sólidos totales</b>	6,40	6,50
<b>Agua</b>	93,60	93,50
<b>Grasa</b>	0,05	0,04
<b>Proteína</b>	0,55	0,55
<b>Nitrógeno no proteico</b>	0,18	0,18
<b>Lactosa</b>	4,80	4,90
<b>Cenizas (Sales minerales)</b>	0,50	0,80
<b>Calcio</b>	0,04	0,12
<b>Fósforo</b>	0,04	0,07
<b>Sodio</b>	0,05	0,05
<b>Potasio</b>	0,16	0,16
<b>Cloruro</b>	0,11	0,11
<b>Ácido láctico</b>	0,05	0,40

### ***1.2.3. Problemática medioambiental***

Los sueros que se generan durante el proceso de fabricación de queso en industrias lácteas no deben ser considerados como agua residual, sino como un subproducto o residuo líquido (MAGRAMA, 2007). El lactosuero constituye el principal subproducto de la industria quesera. Debido a su alto contenido de materia orgánica se considera un importante contaminante en el caso de ser vertido directamente al medio acuático o al terreno. Por otra parte, su vertido a la red de saneamiento puede saturar las estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs).

En España, la normativa medioambiental mediante el Real Decreto Legislativo 1/2001 de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas, no permite el vertido del lactosuero y exige por lo tanto, que se lleve a cabo una adecuada gestión. El responsable de la instalación puede encargarse bien de la reutilización o de la transformación en sus propias instalaciones, u optar por la entrega a otra empresa que se encargue de su uso y/o transformación.

La gestión del lactosuero supone un coste importante originando que la mayor parte de las queserías no puedan afrontar los gastos. Su gestión como residuo supone la pérdida de un producto con un alto contenido en proteínas y lactosa, que pueden ser aprovechados. Las plantas pequeñas no suelen disponer de unidades para la valorización del lactosuero por lo que normalmente éste se recupera y se recoge por un gestor externo para su posterior aprovechamiento.

### ***1.2.4. Aplicaciones del lactosuero***

Algunas de las alternativas planteadas para el aprovechamiento del lactosuero son su aplicación para alimentación animal, alimentación humana, como fertilizante, el aprovechamiento industrial y la valorización energética.



Tradicionalmente, el lactosuero se ha destinado a la alimentación del ganado, principalmente de tipo porcino. Debido a su elevado contenido en agua, se puede concentrar en plantas de secado, con el objetivo de facilitar su manejo y transporte. Posteriormente, este lactosuero deshidratado se puede incorporar en la dieta animal junto con los piensos.

La utilización del lactosuero en la alimentación humana comprende la elaboración de queso a partir de una técnica antigua que se realiza principalmente en países del Mediterráneo. Se distinguen diferentes tipos debido a variaciones en el origen de la leche, el tipo de suero y el proceso de elaboración. En función de la región de origen, se distinguen los quesos denominados “Ricotta” o Requesón, elaborados en Italia y España respectivamente (Pintado, 2001).

El lactosuero también se utiliza como aditivo en la industria láctea durante la elaboración de yogures, helados y otros tipos de postres y en la industria cárnica, pastelera y en la fabricación de bebidas para deportistas o alimentos infantiles (González, 1996).

La obtención de lactosa es otro método de valorización del lactosuero. Se trata de un disacárido que se encuentra presente en todos los tipos de leche. Está constituida por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa, que también pueden ser recuperadas mediante tratamientos de hidrólisis (de Wit, 2001). La lactosa se puede recuperar mediante su cristalización en el suero concentrado sin tratar o del suero desproteinizado por ultrafiltración. El producto que se obtiene es una melaza que puede ser secada y utilizada como pienso para animales. El valor de este pienso puede aumentarse si se desaliniza la melaza y se realiza una adición de proteínas. En los procesos de fabricación de farmacéuticos, se requiere un grado superior de pureza por lo que la lactosa recuperada se somete a tratamientos adicionales para su purificación.

En el caso del aprovechamiento industrial, éste se orienta mayoritariamente al fraccionamiento de sus principales componentes para la recuperación de las proteínas, la lactosa y las sales minerales. Este tipo de plantas son una alternativa viable en el caso de industrias grandes con volúmenes elevados de producción de lactosuero. En el caso de industrias de dimensiones más reducidas, estos sistemas suponen un elevado coste

económico y se opta por la recogida y entrega del lactosuero para su tratamiento posterior en instalaciones externas.

La recuperación de las proteínas contenidas en el lactosuero se orienta a su reutilización en el propio proceso de elaboración del queso, o bien para su aplicación en otros procesos industriales de alimentación. Por otra parte se pueden someter a operaciones de separación y purificación con el objetivo de obtener proteínas de mayor pureza para aplicaciones en la industria farmacéutica. Las proteínas se aíslan mediante técnicas de precipitación, procesos de separación por membranas o cromatografía.

Otro tipo de utilización comprende su uso como fertilizante gracias a su alto contenido en agua y nutrientes que sirven como complementos para los cultivos. Sin embargo, su aplicación debe ser controlada para evitar posibles daños en la estructura físico-química del suelo, derivados del contenido en sales, sólidos y grasas (Prazeres, 2013)

Por último, el lactosuero debido a su contenido en lactosa es un sustrato susceptible de ser valorizado mediante la aplicación en procesos biológicos de fermentación. En función de las condiciones de operación y los microorganismos empleados hay diferentes alternativas de tratamiento. Entre las posibilidades, se pueden aplicar procesos de fermentación alcohólica, orientados a la obtención de etanol, procesos de digestión anaerobia para la producción de biogás o procesos de dos etapas de fermentación oscura y digestión anaerobia para la producción de hidrógeno y biogás.

La lactosa presente en el lactosuero puede ser sometida a un tratamiento de fermentación para la producción de ácido láctico en el que intervienen microorganismos como *Lactobacillus helveticus* o *Lactobacillus casei* entre otros (Plessas et al., 2008). Este producto tiene múltiples aplicaciones como conservante y acidulante en bebidas, alimentos, detergentes, cosméticos y productos farmacéuticos (Tango y Ghaly, 1999).

La fermentación alcohólica para la obtención de etanol ha sido estudiada por diferentes autores, empleando lactosuero bruto (Zafar y Owais, 2006), lactosuero permeado de ultrafiltración (Sansonettil et al., 2009) o soluciones preparadas con lactosuero en polvo (Ozmihci y Kargi, 2007). En este tratamiento se requiere la

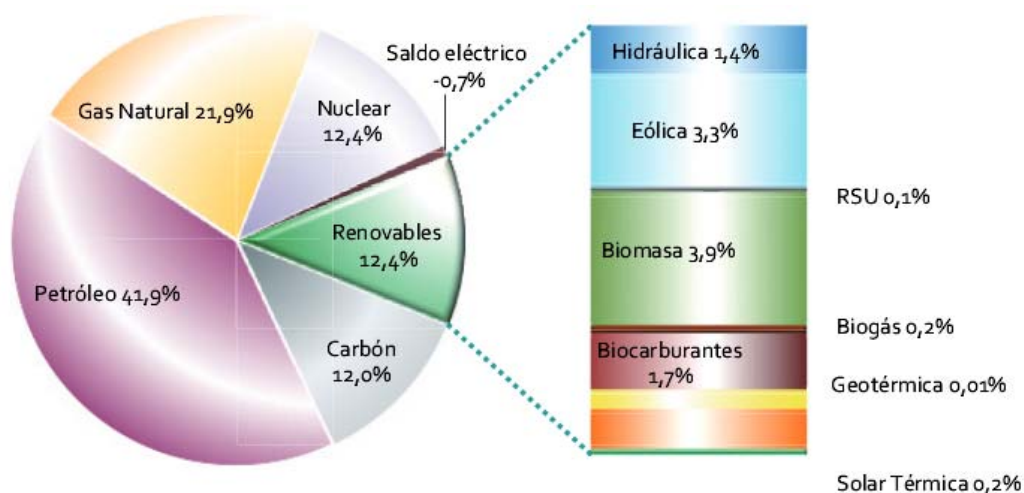
utilización de cultivos específicos de microorganismos capaces de metabolizar la lactosa como *Torula cremoris*, *Kluyveromyces fragilis* o *Saccharomyces cerevisiae* o puede ser necesario incluir un tratamiento enzimático previo (Prazeres et al., 2012). El etanol producido se puede utilizar en la industria alimentaria, química, farmacéutica o como combustible (Staniszewski et al., 2009). Por otro lado, la fermentación alcohólica del lactosuero orientada a la producción de butanol también ha sido estudiada recientemente de cara a su uso como biocombustible (Stoeberl et al., 2011, Raganati., 2013).

## **1.3. SECTOR ENERGÉTICO EN ESPAÑA**

### ***1.3.1. Situación actual***

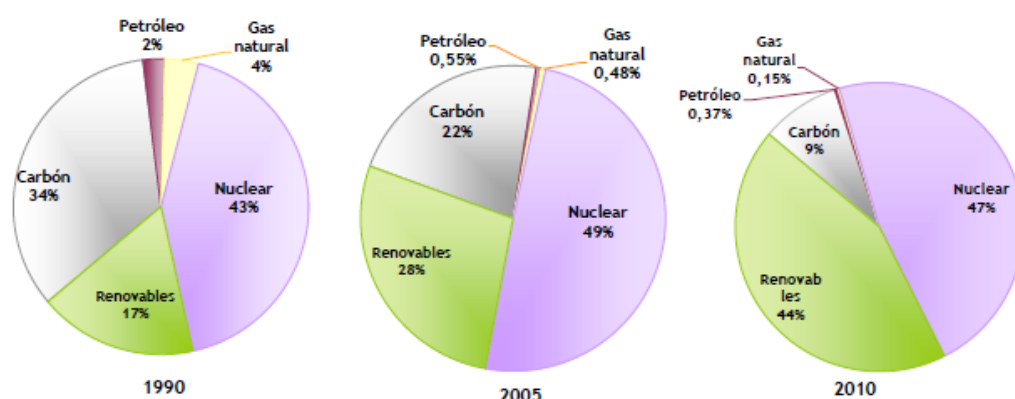
La energía es un elemento imprescindible en cualquier industria o servicio. En la actualidad, la política energética en España se orienta a garantizar el abastecimiento, la competitividad de los mercados de la energía y la protección del medio ambiente (MINETUR, 2013).

En el año 2012 se registró un aumento del consumo de energía primaria de un 1,2% respecto al año 2011, a pesar del descenso registrado de un 5,4% respecto al consumo de energía final. El consumo de energía primaria presentó un crecimiento desde 1990 hasta el 2007, interrumpido por un periodo de descenso, durante los años 2008-2009, debido a la crisis económica (Cátedra BP de Energía y Sostenibilidad, 2013).



**Figura.1.4.** Consumo de energía primaria en España año 2012. Distribución por fuentes energéticas (MINETUR, 2014).

El perfil de distribución de consumo de energía primaria en España se caracteriza por el dominio del petróleo y el gas natural (Figura 1.4). Sin embargo, la energía primaria predominante es la nuclear seguida de las renovables, situándose las producciones interiores de petróleo y gas natural en valores muy bajos en comparación con el consumo, evidenciando la importante dependencia energética exterior (MINETUR, 2014)



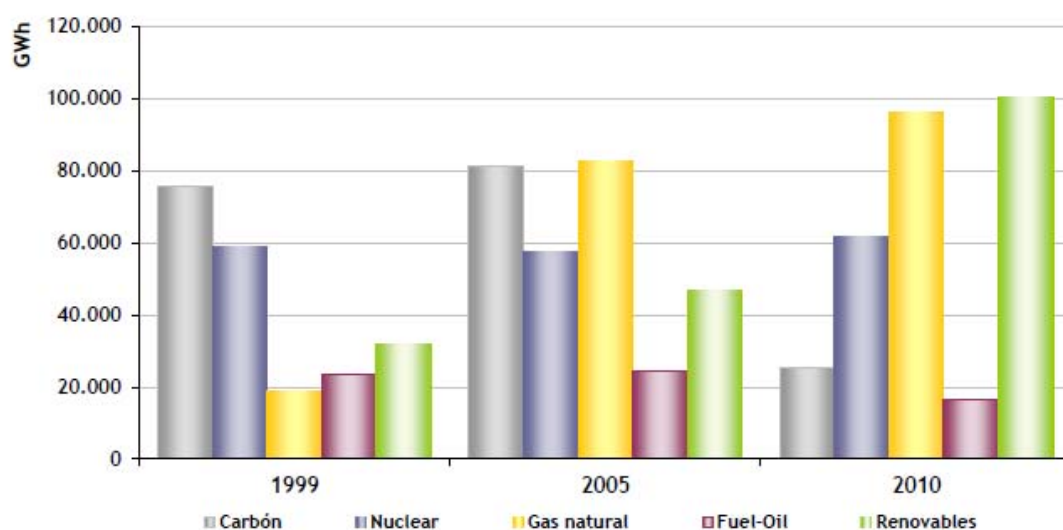
**Figura.1.5.** Evolución de la producción interior de energía por fuentes energéticas. (MINETUR, 2011).

Al comparar la evolución del perfil de producción interior desde 1990, se observa un aumento progresivo del aporte de las energías renovables (Figura 1.5). El desarrollo de las energías renovables figura como uno de los aspectos clave de la

política energética. Por un lado, se considera una herramienta para conseguir la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero. Del mismo modo una mayor participación de éstas en el balance energético puede reducir la dependencia económica de los combustibles fósiles.

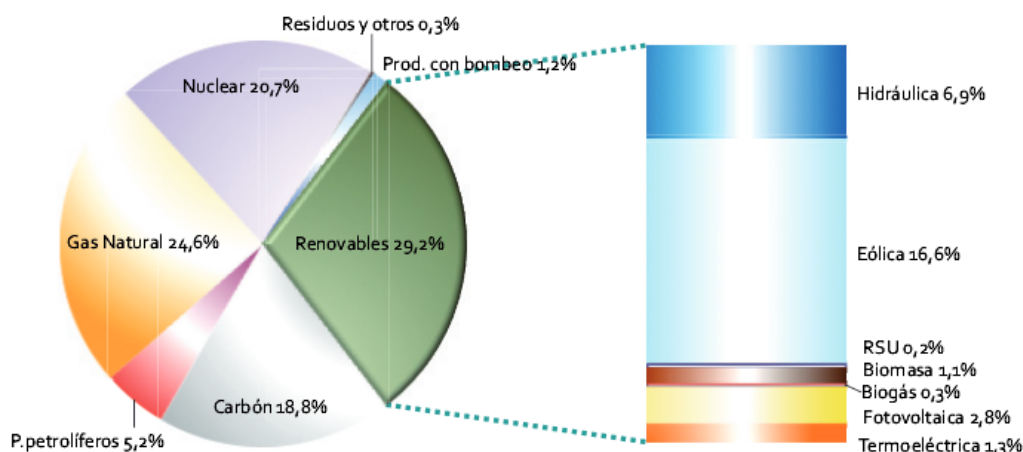
### 1.3.2. Generación eléctrica

La generación eléctrica en España ha experimentado una importante transformación desde finales de los años 90, (Figura 1.6.), a lo que ha contribuido la progresiva penetración del gas natural (principalmente en centrales de ciclo combinado y co-generación) y de las energías renovables, cuya cobertura representó en el año 2010 más del 32% de la producción eléctrica nacional.



**Figura.1.6.** Evolución de la generación de electricidad a partir de diferentes tipos de energía (MINETUR, 2011).

Durante el año 2012 la contribución de las renovables a la generación eléctrica global representó un 29,2% consolidándose como la fuente energética predominante la energía eólica e hidroeléctrica, mientras que la producción a partir de biogás representó tan solo el 0,3% (Figura 1.7).



**Figura.1.7.** Estructura de la generación eléctrica en España año 2012. (MINETUR, 2014).

### 1.3.3. Energías renovables

Con objeto de promover y facilitar el uso de los recursos renovables, desde mediados de los años ochenta, la Administración Española ha publicado como herramienta principal sucesivos planes de energías renovables (PER). El PER 2011-2020, vigente en la actualidad, fue aprobado por acuerdo del Consejo de Ministros de 11 de noviembre de 2011, estableciendo objetivos acordes con la Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. Fija como objetivos generales, conseguir una cuota mínima del **20%** de energía procedente de fuentes renovables en el consumo final bruto de energía de la Unión Europea (UE) y una cuota del **10%** de energía procedente de fuentes renovables en el consumo de energía en el sector del transporte en cada estado miembro para el año 2020 (MINETUR, 2011).

#### 1.3.3.1. Sector del biogás

El biogás es un gas combustible compuesto principalmente por metano (50-70%) y dióxido de carbono que se obtiene durante la descomposición de la materia orgánica en condiciones de ausencia de oxígeno. Los principales sustratos susceptibles de ser utilizados son las deyecciones ganaderas, residuos agroindustriales, la fracción

orgánica de residuos domésticos y similares, los lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y los cultivos energéticos.

El aprovechamiento del biogás generalmente se realiza en motores de combustión interna para la generación de electricidad y calor. También, existe la posibilidad de purificar el biogás hasta obtener una calidad similar a la del gas natural para su inyección en la red o su uso como combustible en vehículos de transporte.

A finales de 2010, la potencia eléctrica instalada con biogás en España era de 177 MW, correspondiendo alrededor del 65% de la potencia instalada y del 70% de la generación al biogás de vertedero. La normativa europea de gestión de residuos, (encaminada a reducir el depósito en vertedero de residuos biodegradables) y los altos potenciales de producción de biogás agroindustrial, hacen pensar que la tecnología que más se desarrollará durante el periodo 2011-2020 será la relacionada con el tratamiento de estos residuos en digestores anaerobios.

Para la elaboración del PER 2011-2020 se realizó una estimación del potencial de producción de biogás en España. El resultado del potencial disponible, se corresponde con los datos de producción de sustratos que pueden ser objeto de una adecuada gestión, mediante su recogida, transporte y almacenamiento, descontando la fracción de producción destinada a posibles usos alternativos (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Potenciales de producción de biogás (MINETUR, 2011)

	Potencial disponible (ktep)
<b>Biogás agroindustrial</b>	1 425,1
<b>Biogás de FORSU</b>	124,5
<b>Biogás de lodos EDAR</b>	123,3
<b>Biogás de vertedero</b>	145,6
<b>Total</b>	1 818,5

Los datos estimados sitúan dicho potencial en aproximadamente 1 818,5 ktep, destacando entre las distintas categorías el biogás agroindustrial con un aporte del 78%.

Algunas de las propuestas orientadas a contribuir en el desarrollo del sector están relacionadas con un uso más eficiente del biogás, un mayor incentivo a la cogeneración, ayudas al uso térmico y un marco normativo y económico propicio para la inyección en red.

## **1.4. BIBLIOGRAFÍA**

Bylund G., 2003. Manual de industrias lácteas. Teknotext, Lund (Suecia).

Catedra BP de Energía y Sostenibilidad, Universidad Pontificia de Comillas, 2013.

Observatorio de Energía y Sostenibilidad en España. Informe basado en indicadores. Edición 2013.

[http://web.upcomillas.es/Centros/bp/Documentos/Actividades/Observatorio/Marzo2014/Informe\\_Observatorio2013\\_web.pdf](http://web.upcomillas.es/Centros/bp/Documentos/Actividades/Observatorio/Marzo2014/Informe_Observatorio2013_web.pdf) (Fecha de referencia 1/4/2014)

de Wit, 2001. Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products, 1st ed., European Whey Products Association, Brussels (Belgium) pp. 88.

Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas (FIAB), 2012. Industria Alimentaria.

<http://www.fiab.es/es/industria/industria.asp> (Fecha referencia 20/9/13)

Federación Nacional de Industrias Lácteas (FENIL) , 2012. Datos del sector.

<http://www.fenil.org/Sector.asp> (Fecha referencia 20/9/13)

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT), 2012.

Statistical Data base.

<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E> (Fecha de referencia 20/9/13)

González, M.I., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review.

Bioresour. Technol. 57, 1-11.



- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), 2012. Fichero coordinado de industrias.  
<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasalimentacion/fichero-industrias/> (Fecha referencia 20/9/13)
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012b. Fichero coordinado de industrias.  
<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/ganaderia/estadistica-industrias-lacteas/estadistica-lactea-anual/default.aspx> (Fecha referencia 17/10/2013)
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), 2007. Manual para la gestión de vertidos. Autorización de vertido. Dirección General del Agua del Ministerio de Medio Ambiente.
- Ministerio de Industria Energía y Turismo (MINETUR), 2011. Plan de Energías Renovables 2011-2020.  
<http://www.minetur.gob.es/energia/es-ES/Novedades/Paginas/PER2011-2020Voll.aspx> (Fecha de referencia 20/3/2014)
- Ministerio de Industria Energía y Turismo (MINETUR), 2013.  
<http://www.minetur.gob.es/energia/eses/secretariadeestado/paginas/objetivos.aspx> (Fecha de referencia 1/4/2014)
- Ministerio de Industria Energía y Turismo (MINETUR), 2014. La Energía en España 2012.  
[http://www.minetur.gob.es/energia/esES/Documents/Energia\\_en\\_Espana.pdf](http://www.minetur.gob.es/energia/esES/Documents/Energia_en_Espana.pdf) (Fecha de referencia 1/4/2014)
- Ozmihci, S., Kargi, F., 2007. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme Microb. Technol.* 41, 876-880.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea (2009). Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 5 de junio de 2009, L140, 16-62.

- Pintado, M.E., Macedo, A.C., & Malcata, F.X., 2001. Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 7, 105-116.
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R., Banat, I.M., 2008. Short communication: lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresour. Technol.* 99, 5951-5955.
- Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J, Patanita M, Dôres J., 2013. Pretreated cheese whey wastewater management by agricultural reuse: Chemical characterization and response of tomato plants *Lycopersicon esculentum* Mill. under salinity conditions. *Sci Total Environ* 463–464, 943-951.
- PROBIOGAS, 2010. Cuantificación de materias primas de origen animal. <http://www.probiogas.es/> (Fecha de referencia 20/10/2013)
- Raganati, F., Olivieri, G., Procentese, A., Russo, M.E., Salatino, P., Marzocchella, A., 2013. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Bioresour. Technol.* 138, 259-265.
- Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., Iorio, G., 2009. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass Bioenerg.* 33, 1687-1692.
- Statistical Office of the European Union (EUROSTAT), 2013. Agricultural products statistics. [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics\\_explained/index.php/Agricultural\\_products](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Agricultural_products) (Fecha referencia 17/10/2013)
- Staniszewski, M., Kujawski, W., Lewandowska, M., 2009. Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of producte. Kinetic model predictions considering glucose repression. *J. Food Eng.* 91 , 240-249.

Stoeberl, M., Werkmeister, R., Faulstich, M., Russ, W., 2011. Biobutanol from food wastes – fermentative production, use as biofuel and the influence on the emissions. *Procedia Food Science* 1, 1867-1874.

Tango, M.S.A., Ghaly, A.E., 1999. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass Bioenerg.* 16, 61-78.

Zafar, S., Owais, M., 2006. Short communication: Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. Eng. J.* 27, 295-298.



## *Capítulo 2*

# *Antecedentes y objetivos*



## 2.1. DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que en condiciones de ausencia de oxígeno, mediante la intervención de un conjunto de bacterias anaerobias facultativas y estrictas, se produce la descomposición de la materia orgánica en una mezcla de gases y un digerido sólido o líquido.

El producto principal es una mezcla de gases que se conoce con el nombre de biogás. Está compuesto principalmente por metano (48-65%), dióxido de carbono (36-41%), nitrógeno (hasta un 17%), sulfuro de hidrógeno (32-169 ppm) y pequeñas proporciones de otros compuestos gaseosos (Ward et al., 2008). Por otra parte el digerido que se descarga de los reactores se conoce como digestato. Está compuesto por la fracción orgánica agotada y la no digerida. Se caracteriza por tener propiedades fertilizantes, debido a que conserva los nutrientes contenidos en el sustrato, como es el caso del nitrógeno, el fósforo o el potasio, mineralizados (Alburquerque et al., 2012). Este digestato puede aplicarse en el terreno directamente o previa separación de la fracción sólida y líquida (Bustamante et al., 2012).

Los procesos anaerobios se suelen equiparar a los tratamientos aerobios. Estas tecnologías constituyen las dos grandes alternativas para el tratamiento biológico de aguas residuales y residuos orgánicos sólidos. Sin embargo, el hecho de que la digestión anaerobia permite un ahorro energético durante su operación, una reducida tasa de formación de biomasa con menores gastos de tratamiento de lodos y que se trate de una tecnología viable y competitiva con la producción simultánea de una energía renovable, hacen que sea una alternativa más favorable (Abbasi et al., 2012).

Por otro lado, la co-digestión anaerobia consiste en el tratamiento simultáneo de dos o más sustratos orgánicos diferentes. La principal ventaja que ofrece es el aprovechamiento de la sinergia de las mezclas ya que se compensan las carencias de cada uno de los sustratos, se incrementa el potencial de producción de biogás y se evitan problemas de inhibición. Además, se unifica la gestión de los residuos al compartir las instalaciones y se reducen costes de inversión y explotación (Mata-Álvarez et al., 2000).

### 2.1.1. Etapas de la digestión anaerobia

El proceso que tiene lugar durante la digestión anaerobia es complejo. Está compuesto por varias etapas que tienen lugar de forma secuencial o simultánea mediante el consorcio de diferentes grupos microbianos. A continuación se describen cada una de las etapas.

La **hidrólisis** es la primera etapa del proceso. Los compuestos orgánicos son solubilizados por enzimas extracelulares excretadas por bacterias hidrolíticas. Se produce la ruptura de los polímeros orgánicos en subunidades más pequeñas, compuestos más sencillos de bajo peso molecular, como son los azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y alcoholes. Estos productos son transportados a través de la membrana celular, para ser posteriormente metabolizados (Figura 2.1). Esta etapa está directamente relacionada con la naturaleza del sustrato y puede ser considerada limitante, debido a que los microorganismos que intervienen durante las etapas posteriores solamente son capaces de actuar sobre la materia orgánica disuelta (Vavilin et al., 2001).

En la segunda etapa, conocida como **acetogénesis**, los compuestos solubles generados durante la hidrólisis son fermentados por la acción de bacterias acidogénicas o fermentativas. Se forman ácidos grasos de cadena corta (Tabla 2.1) y en menor proporción otros compuestos como alcoholes, hidrógeno y dióxido de carbono.

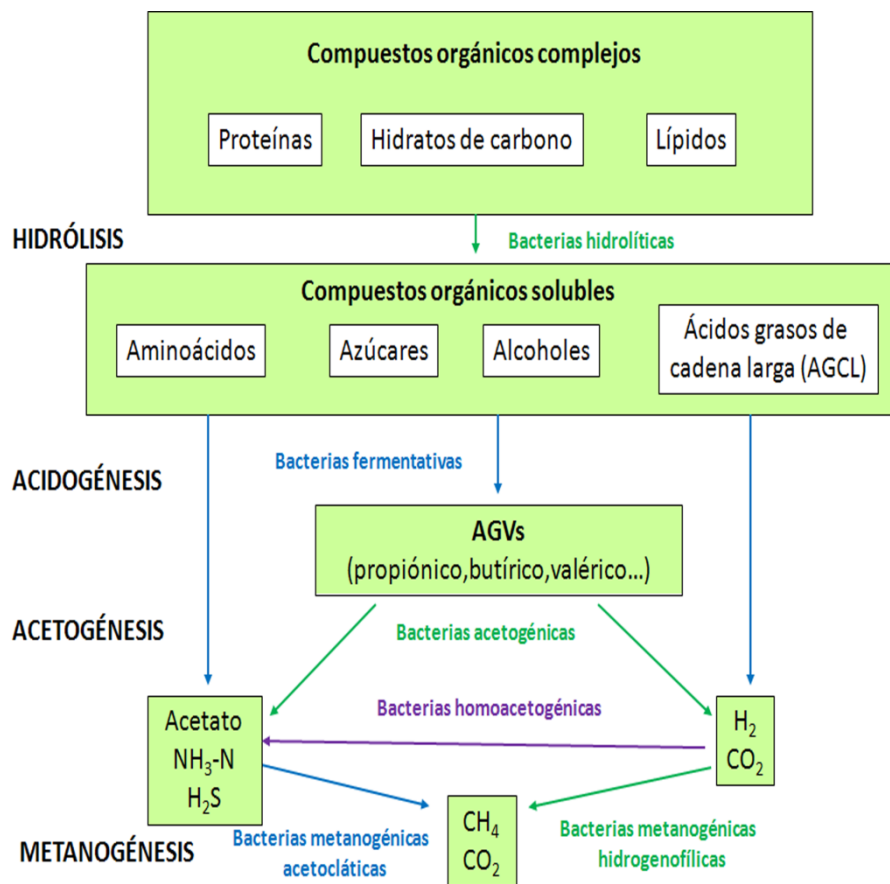
**Tabla 2.1.** Principales ácidos orgánicos generados durante la acidogénesis

Ácidos volátiles	Ácidos no volátiles
Ácido acético	Ácido láctico
Ácido propiónico	Ácido pirúvico
Ácido n-butírico	Ácido succínico
Ácido isobutírico	

En la tercera etapa denominada **acetogénesis**, el ácido acético y el hidrógeno pueden ser metabolizados directamente por las bacterias metanogénicas pero el resto de



productos intermedios de la acidogénesis deben de ser transformados. De esta manera, durante esta etapa son transformados en acetato, dióxido de carbono e hidrógeno. A lo largo de la acetogénesis intervienen dos tipos de bacterias encargadas de producir acetato. Las bacterias **homoacetogénicas**, capaces de producir acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Compiten por el hidrógeno con las bacterias metanogénicas. Las bacterias **acetogénicas productoras de hidrógeno** crecen en asociación sintrófica con los organismos metanogénicos hidrogenotróficos. Éstos mantienen la presión parcial de hidrógeno lo suficientemente baja para que se favorezca la acetogénesis.



**Figura.2.1** Esquema del proceso de digestión anaerobia (Massé y Droste, 2000).

Por último el acetato, el hidrógeno y el dióxido de carbono son transformados en una mezcla gaseosa de metano y dióxido de carbono que se conoce como biogás en la **metanogénesis**. En esta última etapa se diferencian dos tipos principales de bacterias: Las bacterias **metanogénicas hidrogenofílicas**: Este tipo de bacterias utilizan el hidrógeno para reducir el dióxido de carbono y producir metano. Las bacterias

**metanogénicas acetoclásticas:** Hidrolizan el acetato oxidando el grupo carbonilo a dióxido de carbono y reduciendo el grupo metilo a metano.

### ***2.1.2. Parámetros que influyen en el proceso de digestión anaerobia***

Durante el proceso tienen lugar diferentes etapas de degradación. Los microorganismos responsables son específicos y son sensibles a las diferentes condiciones bajo las que puede operar el reactor. Los principales parámetros que influyen en el funcionamiento son:

El pH, la temperatura, composición del sustrato y el contenido en nutrientes.

#### **2.1.2.1. Temperatura**

La temperatura ejerce una importante influencia en la cinética del proceso. Por una parte ejerce un efecto sobre las poblaciones microbianas al influir sobre la velocidad de crecimiento, repercutiendo en la velocidad de consumo de sustrato y consecuentemente en el rendimiento de producción de biogás. Las bajas temperaturas ralentizan el crecimiento de los microorganismos, la velocidad de consumo de sustrato y la producción de biogás, mientras que, al aumentar la temperatura se obtiene el efecto contrario.

Los sistemas anaerobios son muy sensibles a los cambios de temperatura, por lo que se trata de un parámetro que se debe controlar cuidadosamente en los reactores. En función del rango de temperatura se distinguen diferentes regímenes, psicrófilo ( $T < 20\text{ °C}$ ), mesófilo ( $30\text{-}40\text{ °C}$ ) y termófilo ( $45\text{-}60\text{ °C}$ ). La mayoría de los procesos se llevan a cabo en condiciones mesofílicas. Se considera como un régimen más estable y reduce las necesidades energéticas para la calefacción de los reactores (Ward et al., 2008, Fernández et al., 2008). El cambio de condiciones mesofílicas a termofílicas, puede provocar problemas en el funcionamiento de los reactores si no se garantiza un número suficiente de bacterias que se adapten a temperaturas de operación superiores (Boušková et al., 2005). Sin embargo la digestión termofílica presenta varias ventajas como son: cinética más rápida, menor viscosidad del efluente de salida y mayor destrucción de patógenos (Zhu et al., 2009).

### 2.1.2.2. pH

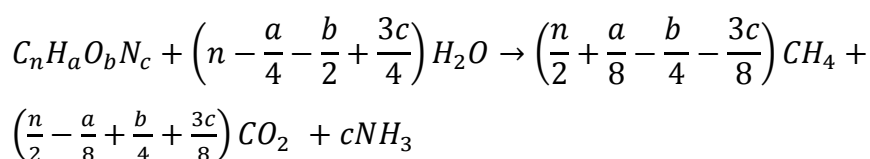
El pH idóneo para la digestión anaerobia se encuentra en torno a 7 unidades, aunque va a estar determinado por la aclimatación de las poblaciones metanogénicas. Varios autores han publicado diferentes rangos óptimos para la digestión anaerobia. Ward et al. (2008), consideran que el pH tiene que estar comprendido en el intervalo 6,8-7,2, pero sin embargo Lee et al. (2009) aumentan este rango a 6,5-8,2.

La hidrólisis y la acidogénesis requieren de valores de pH inferiores. Si se desea priorizar la producción de los compuestos intermedios de estas etapas, se recomienda mantener el pH en el rango 5,5-6,5 (Kim et al., 2003).

El pH es un importante modulador del sistema puesto que influye en varios equilibrios químicos, pudiendo desplazarlos hacia la formación de un determinado componente que tenga influencia en el proceso. Su papel es fundamental en el equilibrio amonio-amoniaco, teniendo por tanto, una gran importancia en el proceso general, por ser el amoniaco libre un inhibidor de la fase metanogénica (Hansen et al., 1998). Este parámetro se suele emplear en el control y seguimiento del funcionamiento de los sistemas anaerobios, aunque manifiesta cambios una vez que se ha producido alguna alteración en el proceso, por lo que se hace necesario mantener el control de otro tipo de variables simultáneamente.

### 2.1.2.3. Composición del sustrato

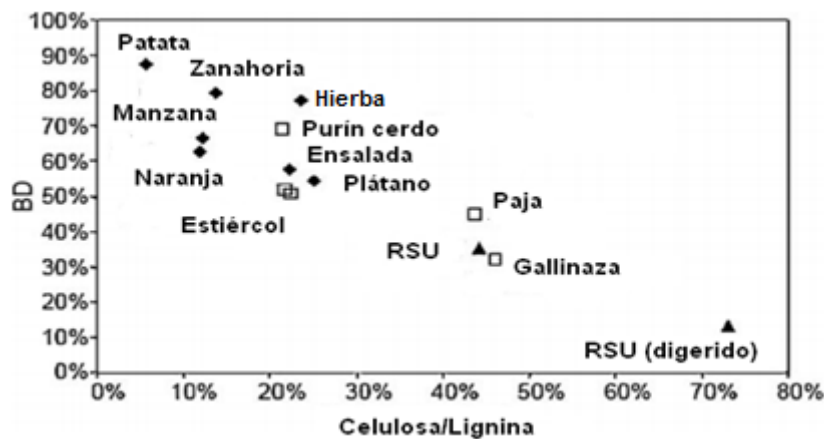
La fuente de carbono, determinada por el contenido en carbohidratos, lípidos, proteínas o fibra del sustrato, ejerce una influencia sobre el rendimiento del proceso de digestión anaerobia. Simons y Buswell desarrollaron la fórmula de Buswell (Nallathambi Gunaseelan, 1997) (Ecuación 1), que permite estimar la producción teórica de metano a partir de la composición de C, H, O y N del sustrato.



$$B_{o,th} = \frac{22.4 \left( \frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - \frac{3c}{8} \right)}{12n + a + 16b + 14c} L CH_{4,STP} / g SV \quad (1)$$

Los carbohidratos simples como la glucosa, la sacarosa, la lactosa, aminoácidos o ácidos grasos volátiles, no necesitan de etapa de hidrólisis para su rotura en moléculas más sencillas, por lo que son considerados compuestos fácilmente biodegradables. Compuestos más complejos como la celulosa, las proteínas o los ácidos grasos de cadena larga, deben de ser previamente hidrolizados a compuestos más sencillos.

Mediante la fórmula de Buswell, se estima que los carbohidratos tienen el potencial de producción de metano más bajo (415 L CH<sub>4</sub>/kg SV), mientras que los lípidos suponen el potencial más alto (1 014 L CH<sub>4</sub>/kg SV). La hemicelulosa y la lignina son compuestos de difícil degradación, conforme aumenta el contenido de estos compuestos se reduce la biodegradabilidad (Figura 2.2) (Buffiere et al., 2006).



**Figura.2.2.** Influencia del contenido de celulosa y lignina sobre la biodegradabilidad de varios residuos orgánicos. Residuos sólidos urbanos (RSU) (Buffiere et al., 2006).

#### 2.1.2.4. Nutrientes

Los microorganismos anaerobios requieren para su adecuado desarrollo y crecimiento de una serie de nutrientes. En los digestores anaerobios es imprescindible la presencia de una cantidad mínima de nitrógeno, fósforo y azufre. Normalmente se sugiere que se cumpla la relación de contenido C:N:P:S de 600:15:5:3 (Fricke et al., 2007). Para ello, es recomendable que los sustratos contengan relaciones

de C:N comprendidas entre 20-30 que garanticen el suministro de nutrientes a los sistemas. Por otra parte, la cantidad de nitrógeno no debe de ser elevada, para evitar la formación excesiva de compuestos nitrogenados que puedan originar inhibición en los reactores. Algunos de los principales elementos que se consideran nutrientes esenciales en los procesos anaerobios figuran detallados en la Tabla. 2.2.

**Tabla. 2.2.** Principales nutrientes requeridos durante la digestión anaerobia (Kayhanian y Rich, 1995).

Nutriente	Funciones
<b>Carbono, C</b>	Fuente de energía, síntesis de material celular
<b>Nitrógeno, N</b>	Síntesis de proteínas
<b>Fósforo, P</b>	Síntesis de ácido nucleico
<b>Potasio, K</b>	Regular la permeabilidad de las células
<b>Azufre, S</b>	Actividad enzimática
<b>Cobalto, Co</b>	Actividad enzimática dehidrogenasa monóxido de carbono, (CODH) y corrinoides
<b>Cobre, Cu</b>	Actividad enzimática hidrogenasa y (SODMS)
<b>Hierro, Fe</b>	Actividad enzimática, CODH, precipitación de sulfatos.
<b>Molibdeno, Mo</b>	Actividad enzimática, formato dehidrogenasa (FDH), inhibir bacterias sulfato reductoras
<b>Níquel, Ni</b>	Actividad enzimática CODH
<b>Selenio, Se</b>	Actividad enzimática, FDH, metabolismo de AGV
<b>Tungsteno, W</b>	Actividad enzimática, FDH, conversión de CO <sub>2</sub> / H <sub>2</sub>
<b>Zinc, Zn</b>	Actividad enzimática, FDH, CODH, hidrogenasa

### 2.1.3. Tóxicos e inhibidores

Los compuestos inhibidores se pueden formar como subproductos durante el proceso anaerobio o bien, dependiendo del origen del sustrato, estar presentes en su composición. Estas sustancias, si se acumulan en los reactores, pueden ser causantes de problemas de inhibición y fallo del proceso. Algunos de los principales compuestos de este tipo son: el nitrógeno amoniacal, el sulfuro, los metales pesados y los compuestos orgánicos.

#### 2.1.3.1. Nitrógeno amoniacal

El nitrógeno amoniacal se genera durante la degradación de los compuestos de nitrógeno. Incluye los iones amonio,  $NH_4^+$ , y el amoniaco libre,  $NH_3$ . La concentración de cada una de estas dos especies depende de la temperatura y el pH y se puede calcular mediante la ecuación 2:

$$NH_4^+ \leftrightarrow NH_3 + H^+$$
$$\frac{[NH_3]}{[NH_3 + NH_4^+]} = \left( 1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-(0.09018 + \frac{2729.92}{T})}} \right)^{-1} \quad (2)$$

El amoniaco libre se considera como el principal causante de los problemas de inhibición, debido a que se trata de una molécula capaz de permear a través de las membranas celulares originando desequilibrio de protones. Dependiendo de las condiciones de operación, el inóculo utilizado y el grado de adaptación se han identificado diferentes rangos de concentración de tolerancia al amonio. En el caso de inóculo que no se ha sometido a tratamientos de adaptación previos, aparecen problemas de inhibición cuando se supera el rango de concentración de 1 700-1 800 mg/L (Yenigün y Demirel, 2013). Sin embargo, con una adaptación previa, durante la digestión anaerobia de purines y lodos de depuradora en condiciones mesofílicas, Van Velsen et al. (1979), detectaron problemas de inhibición a concentraciones de amonio superiores a 3 075 mg/L y de 5 000 mg/L respectivamente.

Respecto al amoníaco libre, las concentraciones máximas de tolerancia oscilan desde 200 mg/L para sistemas sin adaptación (Yenigün y Demirel, 2013), hasta 700-1100 mg/L en procesos sometidos a aclimatación (Hansen et al., 1998, Angelidaki y Ahring, 1994).

### **2.1.3.2. Ácidos grasos volátiles**

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son los principales compuestos intermedios del proceso anaerobio. No obstante, cuando se registran altas concentraciones, pueden afectar a los microorganismos, principalmente a las bacterias metanógenas. La acumulación de estos compuestos suele ser un indicio de posibles fallos producidos por variaciones de la temperatura, una sobrecarga orgánica o presencia de compuestos tóxicos. Bajo estas condiciones, el H<sub>2</sub> y los AGVs no son metabolizados a una velocidad adecuada y se produce su acumulación en los reactores, acompañada de un descenso del pH que puede inhibir el desarrollo de las etapas de hidrólisis y acetogénesis.

Se han determinado diferentes valores máximos de concentración de AGVs que pueden provocar fallos en los sistemas. La hidrólisis de la celulosa se inhibe con concentraciones de AGVs superiores a 2 g/L mientras que con glucosa como sustrato, los problemas se observan con concentraciones por encima de 8 g/L (Siegert y Banks, 2005). El ácido propiónico se considera el AGV con más influencia sobre los metanógenos, y se considera fácilmente acumulable debido a que para su conversión requiere una presión parcial de H<sub>2</sub> reducida. Se ha establecido que las concentraciones máximas permitidas de propiónico están comprendidas entre 1-2 g/L, mientras que de ácido acético las concentraciones pueden alcanzar 10 g/L (Wijekoon et al., 2011).

### **2.1.3.3. Ácidos grasos de cadena larga**

Los lípidos presentes en los sustratos son compuestos con alto potencial de producción de biogás aunque su contenido en ácidos grasos de cadena larga puede suponer un efecto perjudicial sobre las bacterias acetoclásticas y metanógenas. Además,

son responsables de la aparición de problemas de flotación del lodo y formación de espumas, dificultando el transporte del sustrato y el biogás (Long et al., 2012).

Las concentraciones límite de inhibición no están muy claras en la bibliografía y depende mucho del tipo de ácido graso, así como de la forma en que se encuentra. La inhibición está muy relacionado con la adaptación de los microorganismos, y prácticamente condicionado a la existencia de microorganismos acetogénicos que degraden los AGCL a medida que se van produciendo por hidrólisis de los lípidos, evitando así, alcanzar concentraciones tóxicas (Angelidaki y Ahring, 1992).

### 2.1.3.4. Sulfuro

El sulfato,  $\text{SO}_4^{2-}$ , presente en los sustratos es reducido por acción de las bacterias sulfato reductoras, a sulfuro,  $\text{S}^{2-}$ . Estas bacterias compiten con las metanogénicas por los donantes de electrones, acetato e  $\text{H}_2$ . El azufre es un nutriente necesario para el crecimiento bacteriano, pero el azufre como sulfuro, puede ser tóxico. Se considera que la toxicidad está provocada por el  $\text{H}_2\text{S}$ , porque solo las moléculas neutras pueden permear bien a través de la membrana. Se consideran inhibitorias las concentraciones superiores a 3-6 mmol/L S y 2-3 mmol/L de  $\text{H}_2\text{S}$ , siendo las bacterias metanogénicas las más sensibles (Appels et al., 2008).

### 2.1.3.5. Metales

Algunos metales como el sodio o el potasio si alcanzan concentraciones elevadas pueden ocasionar toxicidad o inhibición sobre los microorganismos. El sodio es esencial para la formación del ATP o la oxidación de NADH. En el caso del potasio, este metal en altas concentraciones puede dar lugar a la neutralización del potencial de la membrana celular.

Los niveles máximos de estos elementos oscilan en función de las condiciones de operación, la adaptación previa de los microorganismos o la presencia de otros elementos que puedan influir sobre su toxicidad. El sodio en concentraciones 3 500-5 500 mg/L, inhibe moderadamente, mientras que con valores por encima de 8 000 mg/L se agravan los efectos inhibitorios (McCarthy P.L. y McKinney R.E.,



1961). Respecto al potasio, concentraciones comprendidas entre 12 000-28 000 mg/L son responsables de inhibición (Fang et al., 2011, Onodera., 2013).

#### **2.1.3.6. Metales pesados**

Diferentes enzimas y co-enzimas requieren unas concentraciones mínimas de metales para su activación y operación. Sin embargo cuando se exceden estas cantidades, se pueden originar problemas inhibitorios o tóxicos sobre los microorganismos. Algunos de estos metales son el Cadmio, Cobre, Zinc, Plomo o Cromo. El enlace de estos elementos con las enzimas, pueden dañar su estructura dando lugar a fallos de sus funciones (Appels et al., 2008).

### ***2.1.4. Experiencias de la digestión anaerobia para el tratamiento de lactosuero***

#### **2.1.4.1 Digestión anaerobia**

El lactosuero debido a su elevado contenido en materia orgánica, reducida alcalinidad y tendencia a acidificar rápidamente se ha identificado como un sustrato de difícil tratamiento en digestores anaerobios, especialmente en reactores que operan con cargas orgánicas de alimentación altas (Malaspina et al., 1995). Por ello se plantea la necesidad de adicionar una dosis inicial de alcalinidad o una dosificación a lo largo del proceso (Yang et al., 2003). Sin embargo, el desarrollo y mejora de los sistemas de tratamiento anaerobio ha demostrado que se trata de un sustrato válido e interesante para su valoración energética. Se han realizado diversos estudios de digestión anaerobia de lactosuero a escala de laboratorio y piloto, utilizando diferentes tipos de reactores, variando regímenes de operación y temperatura (Chatzipaschali y Stamatis, 2012). Durante los últimos años se han publicado varios trabajos que describen las principales opciones de tratamiento y aprovechamiento del lactosuero, incluyendo la valorización energética (Chatzipaschali y Stamatis, 2012, Prazeres et al., 2012, Prazeres et al., 2013, González, 1996, Demirel et al., 2005).

Los reactores que se han utilizado más frecuentemente son los de flujo ascendente con lecho/manto de lodos, conocidos por las siglas UASB, (siglas en inglés de “upflow anaerobic sludge blanket”). También es frecuente la utilización de los filtros anaerobios, principalmente de flujo ascendente (UAF), (siglas en inglés “upflow anaerobic filter”). En los reactores UASB, los microorganismos adoptan la estructura de lodo granular, agregándose para formar flóculos y gránulos que sedimentan fácilmente. Estos reactores han sido recomendados para el tratamiento de residuos lácteos ya que permiten el tratamiento de elevados volúmenes de alimentación en cortos periodos de tiempo (Demirel et al., 2005). Varios autores han publicado trabajos aplicando este tipo de sistemas, que se encuentran resumidos en la tabla 2.3.

En los filtros anaerobios, la biomasa se encuentra adherida a la superficie de un medio inerte en forma de bio-película, o bien retenida en forma de lodo floculado o granulado. Algunos de los problemas que presentan este tipo de reactores y limitan su eficiencia son derivados de un exceso de acumulación de biomasa que origina la inundación o la aparición de zonas muertas. El UAF presenta el inconveniente de que la mayor parte de la biomasa fermentativa se acumula en la parte inferior debido a que es la zona en la que se establece el primer contacto con la alimentación. Con el objetivo de reducir esta tendencia, se ha optado por la utilización de filtros con múltiples entradas para la distribución de la alimentación (Puñal et al., 1999).

Para intentar remediar algunos de los problemas de este tipo de reactores, como es el caso de los largos periodos de tiempo necesarios para el arranque, se han propuesto reactores híbridos, como el UASFF (siglas en inglés de “up-flow anaerobic sludge fixed film”), en los que se combinan los reactores UASB y los filtros anaerobios. Este tipo de sistemas han sido aplicados para el tratamiento de residuos lácteos (Najafpour et al., 2008). También se ha planteado la utilización de reactores de bio-película móvil, en los que la biomasa crece adherida sobre un soporte plástico móvil (Rodgers et al., 2004).

El reactor continuo de tanque agitado (CSTR, “continuously stirred tank reactor”) también se ha utilizado para el tratamiento de lactosuero diluido y soluciones sintéticas de lactosuero. Sin embargo, debido al lento crecimiento de los microorganismos metanogénicos, este tipo de reactores presenta rendimientos de conversión de materia orgánica decrecientes, 58-18%, al reducir el tiempo de retención

hidráulica (TRH) (Yan et al., 1988). Sin embargo, la operación en régimen termofílico puede conseguir un incremento significativo en la conversión tal y como lo demuestran los resultados obtenidos por Yang et al. (2003) quienes consiguieron conversiones de demanda química de oxígeno (DQO) comprendidas entre 94,6-96,4% .

Gavala et al. (1999) realizaron una comparativa de los reactores UASB y CSTR para el tratamiento de lactosuero. Demostraron que para cargas superiores a 40-42 g DQO/L, los TRH necesarios en un UASB eran relativamente altos por lo que la aplicación de un reactor CSTR resulta viable.

Los reactores anaerobios secuenciales (ASBR) (siglas en inglés de “anaerobic sequencing batch reactor”) se han empleado para el tratamiento de residuos lácteos consiguiéndose conversiones de DQO y de demanda biológica de oxígeno (5 d) (DBO<sub>5</sub>) del 62 y el 75%, respectivamente para un TRH de 6 horas (Banik y Daguet, 1997). Este tipo de reactor, opera mediante un sistema semi-continuo, contando con una etapa de alimentación, reacción, sedimentación (para la separación de la biomasa granular del líquido tratado) y finalmente una fase de descarga, en donde el sobrenadante es retirado.

Göblos et al. (2008), evaluaron la digestión anaerobia de lactosuero bruto y suero acidificado en ASBR sin control de pH, aplicando una fermentación previa con *Kluyveromyces lactis*. El TRH se redujo de 40 a 5 días con variaciones en la carga orgánica de 1,6-12,8 g DQO/ L d. Observaron un descenso de la tasa de eliminación de DQO al aumentar la carga de alimentación y ésta fue mayor en el sistema con suero acidificado.

Tabla.2.3. Trabajos de digestión anaerobia de lactosuero

Tipo de reactor	T	Carga orgánica	Rendimiento	Conversión (%)	Referencia
<b>UASB</b>	35	4,5-38,1 g DQO/L	9,57 L CH <sub>4</sub> /L d	98	(Yan et al., 1990)
<b>UASB</b>	35	77 g DQO/L	-	90	(Kalyuzhnyi et al., 1997)
<b>UASB</b>	35	22,6-24,6 g/L d	-	95-97	(Ergüder et al., 2001)
<b>UASB</b>	35	2-7,3 g DQO/L d	-	85-99	(Gavala et al., 1999)
<b>Filtro varias alimentaciones</b>	35	20 kg/m <sup>3</sup> d	-	-	(Puñal et al., 1999)
<b>UAF</b>	37	12-60 g DQO/L	6,7 L/L d (biogás 71%)	81	(Patel et al., 1995)
<b>UAF</b>	35	1-4 g DQO/L d	280 L/kg DQO	80-90	(Gannoun et al., 2008)
<b>Reactor híbrido multietapa</b>	35	3 g DQO/L d	330 L/kg DQO	98	(Malaspina et al., 1996)
<b>USFF</b>	36	7,9-45,42 g DQO/L d	6,75 L/d	97,5-98	(Najafpour et al., 2008)
<b>CSTR</b>	35	1,5-2,3 g DQO/L d	-	83-92	(Gavala et al., 1999)
<b>CSTR</b>	55	1 g DQO/L d	0,35 L CH <sub>4</sub> /g DQO	94,6	(Yang et al., 2003)
<b>Reactor bio-película móvil</b>	35	11,6 g DQO L d	334 L/ kg DQO	89	(Rodgers et al., 2004)
<b>ASBR</b>	50	1,6-12,8 g DQO/ L d	122-197 L CH <sub>4</sub> /kg DQO <sub>elim</sub>	68	(Göblös et al., 2008)
<b>ASBR</b>	30	0,6-4,8 g DQO/ L d	-	90	(Mockaitis et al., 2006)

#### **2.1.4.2 Co-digestión anaerobia**

La utilización del lactosuero en procesos de co-digestión se ha propuesto como una alternativa para evitar algunos de los posibles problemas derivados de su reducido contenido en alcalinidad o nutrientes. La mayoría de los trabajos publicados se han orientado a la co-digestión con residuos ganaderos (Lo y Liao, 1989, Comino et al., 2012, Kavacik y Topaloglu, 2010, Gelegenis et al., 2007).

Bertin et al., (2013) aplicaron un sistema de dos fases para la co-digestión con estiércol y lactosuero. Realizaron pruebas para determinar la proporción de mezcla más adecuada y compararon la operación de un sistema en continuo de 2 fases frente a un digestor individual. Se detectó una notable mejoría con el sistema de 2 fases que permitió registrar una producción de 258 mL CH<sub>4</sub>/g SV. También se han obtenido resultados favorables aplicando lactosuero como co-sustrato para mejorar la productividad de los digestores anaerobios de lodos de EDAR (Shilton et al., 2013, Powell et al., 2013).

## **2.2. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO. FERMENTACIÓN OSCURA**

El desarrollo de sistemas de producción de hidrógeno por vía biológica se debe principalmente a que surge como una alternativa energética a los combustibles fósiles con un impacto ambiental bajo desde el punto de vista de generación de gases de efecto invernadero. La necesidad de reducir la dependencia de los combustibles fósiles, ha fomentado la investigación y el desarrollo de procesos alternativos para la producción de H<sub>2</sub>. La biomasa es un recurso renovable que mediante diferentes tecnologías como la gasificación, la pirolisis o los procesos biológicos puede transformarse en H<sub>2</sub>. Frente a los procesos tradicionales como son el reformado con vapor de metano y otros hidrocarburos, la oxidación parcial no catalítica, gasificación de combustibles fósiles o la electrólisis del agua entre otros (Kapdan y Kargi, 2006), los procesos biológicos se presentan como métodos alternativos que utilizan la luz solar, el CO<sub>2</sub> o residuos orgánicos como sustratos. Entre los principales métodos destacan la biofotólisis, la

fotofermentación, la electrólisis biocatalítica y la fermentación oscura (Redwood et al., 2009).

La fermentación oscura es un proceso que en condiciones anaerobias y de ausencia de luz, permite la obtención de H<sub>2</sub> mediante la fermentación de compuestos orgánicos. Este proceso puede ser llevado a cabo tanto por cultivos mixtos de microorganismos como cultivos puros. La mayoría de las bacterias productoras de H<sub>2</sub> pertenecen al genero *Clostridium*, aunque también son conocidas como especies productoras de H<sub>2</sub> especies del genero *Enterobacter* y *Bacillus* (Levin et al., 2004).

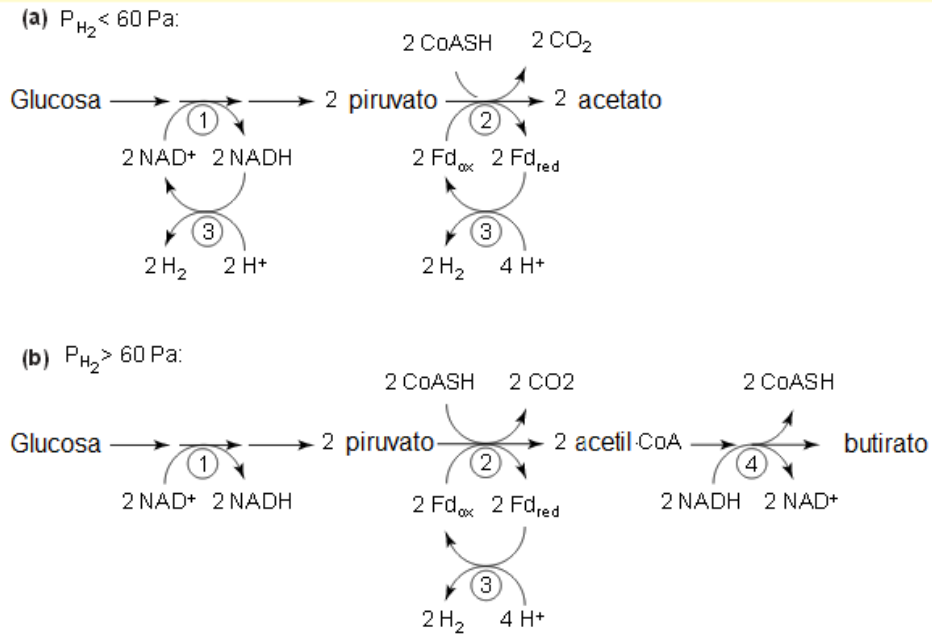
Los procesos de generación de hidrógeno por vía biológica se fundamentan en la presencia de una enzima productora de hidrógeno capaz de catalizar la reacción 3:



En la actualidad, las enzimas que se conocen con capacidad para llevar a cabo esta reacción son la nitrogenasa y la hidrogenasa, (Fe-hidrogenasa y NiFe-hidrogenasa) (Hallenbeck y Benemann, 2002).

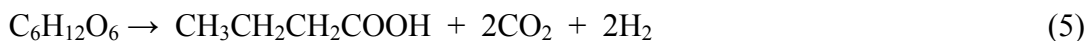
Se han realizado numerosos estudios para describir las rutas metabólicas que conducen a la producción de H<sub>2</sub>. En primer lugar, las hexosas son metabolizadas hasta piruvato mediante la glucólisis, también conocida como ruta Embden-Meyerhoff o mediante la ruta alternativa de Entner-Doudoroff. En ambas rutas, por cada mol de hexosa transformado se producen dos moles de piruvato y dos de nicotinamida adenina reducido (NADH) (Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007). Posteriormente, en la mayoría de sistemas biológicos fermentativos, se produce la descarboxilación oxidativa del piruvato mediante la acción del complejo enzimático piruvato-ferredoxina-óxido-reductasa (PFOR). En esta ruta una parte de los electrones es transferida a protones para producir hidrógeno y el resto a NAD<sup>+</sup> para generar NADH. En condiciones de presión parcial de hidrógeno reducida (< 60 Pa), este NADH, puede ser utilizado para la producción de H<sub>2</sub>, por medio de la hidrogenasa, con una producción adicional de 2 mol H<sub>2</sub>/mol hexosa. Cuando la presión parcial es

superior, es oxidado mediante otras rutas, tales como la fermentación butírica (Figura 2.3).



**Figura. 2.3.** Reacciones del metabolismo de la glucosa. 1. Fermentación de la glucosa a piruvato mediante la ruta Entner-Doudoroff. 2. Descarboxilación oxidativa del piruvato mediante la PFOR. 3. Formación de hidrógeno por acción de la enzima hidrogenasa. 4. Fermentación butírica. (Angenent et al., 2004)

Cuando el acetato es el producto final se obtiene el máximo rendimiento teórico de 4 mol de  $H_2$ /mol de glucosa (reacción 4). Cuando lo es el butirato este rendimiento es de 2 mol de  $H_2$ /mol de glucosa (reacción 5) (Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007).



La generación de otros productos de fermentación como el etanol o el ácido láctico, es debida al desarrollo de rutas metabólicas en las que no hay producción de  $H_2$  siendo los rendimientos inferiores a 2 mol  $H_2$  /mol hexosa.

### 2.2.2. Factores de influencia en la fermentación oscura

La producción de hidrógeno está influida por varios factores: el pH, la temperatura, modo de operación y reactor y tipo de inóculo.

#### 2.2.2.1. Inóculo

Los ensayos de producción de H<sub>2</sub> se llevan a cabo mediante cultivos puros y mixtos. Los primeros suelen contener especies como *Clostridium* y *Enterobacter*. Las especies del género *Clostridium* son bacilos, gram-positivas, anaerobias estrictas y formadoras de esporas. Mientras, las *Enterobacter* son bacilos, gram-negativas y anaerobias facultativas (Wang y Wan, 2009). Los cultivos mixtos se presentan como una opción sencilla y económica frente a los cultivos puros con vistas a una aplicación industrial. Las bacterias productoras de H<sub>2</sub> están presentes en lodos de depuradora, lodos anaerobios, suelos o compost, por lo que muestras de alguno de éstos pueden ser utilizadas como inóculo (Hawkes et al., 2007). El inconveniente que presentan estos cultivos es la presencia de bacterias consumidoras de H<sub>2</sub> que compiten con las productoras, reduciendo los rendimientos (Wang y Wan, 2009). Por este motivo, es necesario realizar algún tipo de pretratamiento para fomentar la persistencia de las bacterias productoras de H<sub>2</sub>. Entre las opciones posibles figuran tratamientos de choque térmico, acidificación, adición de alcalinidad, aireación o adición de reactivos químicos (Kan, 2013).

#### 2.2.2.2. pH

El pH es un factor determinante en la actividad de los microorganismos productores de H<sub>2</sub> y el proceso de fermentación, debido a su influencia en la hidrogenasa y en las rutas metabólicas. Se han realizado numerosos estudios con el objetivo de determinar el pH óptimo para maximizar el rendimiento de la producción de H<sub>2</sub>. Hay diversidad de rangos propuestos en función de las condiciones de operación, temperatura, sustrato o inóculo utilizado. Normalmente se opta por mantener un pH comprendido entre 4,5-6 que favorece la formación de acetato y butirato, mientras que inhibe el crecimiento de los metanógenos (Mu et al., 2006, Spagni et al., 2010). Para



mantener el pH en estos valores, normalmente se emplea hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

En la economía de los procesos biológicos la carga orgánica de alimentación juega un papel importante, ya que un aspecto a tener en cuenta es que conforme aumenta la carga orgánica las necesidades de alcalinidad del sistema para mantener el pH en condiciones adecuadas aumentan, con el correspondiente incremento en gastos. Por otra parte, han sido detectados problemas durante el post-tratamiento del efluente de estos sistemas en una segunda fase metanogénica producidos por acumulación de cationes, como sodio o calcio, adicionados durante el control del pH (Ahn et al., 2006, Bashir y Asif, 2005).

### **2.2.2.3. Temperatura**

La mayoría de los estudios de fermentación oscura se han realizado en condiciones mesofílicas (Guo et al., 2010). Sin embargo, el aumento de la temperatura favorece la permanencia de los microorganismos productores de H<sub>2</sub>. En trabajos realizados en discontinuo, se obtuvieron rendimientos de producción de H<sub>2</sub> superiores en condiciones termofílicas que en mesofílicas debido a la inhibición de bacterias consumidoras de H<sub>2</sub> a temperaturas altas (Kargi et al., 2012a, Valdez-Vazquez et al., 2005). Se han identificado diferentes especies de bacterias termofílicas pertenecientes al género *Thermoanaerobacterium* que producen hasta 1,96 mol H<sub>2</sub>/mol hexosa a 60 °C (O-Thong, 2009). Por otra parte, durante el tratamiento de sustratos lignocelulósicos, la aplicación de temperaturas termofílicas ha permitido obtener mayores rendimientos de producción al mejorar el desarrollo de la etapa de hidrólisis (Guo, 2010). No obstante, el principal inconveniente que presentan los sistemas termofílicos es el aumento de los costes de operación derivados del incremento del consumo energético para la calefacción.

### **2.2.2.4. Presión parcial de H<sub>2</sub>**

Cuando aumenta la presión parcial de H<sub>2</sub> en los reactores se favorece el desarrollo de rutas metabólicas para la formación de solventes con una disminución de la producción de este gas. Para evitar esta alteración, es importante controlar la

agitación en los sistemas (Hawkes et al., 2007). Otra posibilidad es aplicar lo que se conoce como “sparging”, que consiste en la inyección de un gas como N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> para favorecer su desplazamiento desde la fase líquida a la gaseosa (Moreno y Gómez, 2012). Por último también existe la posibilidad de utilizar membranas para recuperar el H<sub>2</sub> (Tepliyakov et al., 2002).

### **2.2.2.5. Nutrientes**

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes para el crecimiento de las bacterias.. Normalmente se pueden utilizar fuentes de nitrógeno orgánico como peptona o extracto cárnico, aunque también es posible adicionarlo en forma inorgánica como urea o compuestos de amonio (Wang et al., 2008). También son necesarios los fosfatos por su capacidad tampón, junto con un aporte del catión de hierro, Fe<sup>2+</sup>, esencial para la actividad enzimática de la hidrogenasa (Wang y Wan, 2009).

### **2.4.2. Producción de hidrógeno a partir de lactosuero**

La producción de H<sub>2</sub> utilizando lactosuero como sustrato ha sido estudiada previamente por diferentes autores. Existen publicaciones de trabajos en régimen discontinuo y continuo que han sido realizados principalmente realizados en reactores tipo CSTR (Yang et al., 2007, Azbar et al., 2009b, Davila-Vazquez et al., 2009), UASB (Castelló et al., 2009, Carrillo-Reyes et al., 2012) y reactores empacados (Perna et al., 2013).

Los experimentos en discontinuo se han llevado a cabo con el objetivo de evaluar la influencia de parámetros como el pH (Ferchichi et al., 2005), la temperatura (Kargi et al., 2012b, Azbar et al., 2009a), el tipo de inóculo (Yang et al., 2007, Davila-Vazquez et al., 2008), pre-tratamientos o la adición de nutrientes para maximizar la producción de hidrógeno. Los principales trabajos se encuentran resumidos en la tabla 2.4.

En los reactores en régimen continuo (Tabla 2.5) se ha evaluado principalmente el efecto de las variaciones de la carga orgánica o TRH (Yang et al., 2007, Davila-

Vazquez et al., 2009), así como la operación en diferentes regímenes de temperatura (Azbar et al., 2009b). El principal problema que se ha manifestado ha sido la reducción de la producción de H<sub>2</sub> debido a la presencia de bacterias metanogénicas o no productoras de H<sub>2</sub>, que desencadenan una competencia por el consumo del sustrato (Castelló et al., 2009, Perna et al., 2013).

También se han publicado algunos trabajos que contemplan el tratamiento del efluente ácido mediante una segunda etapa de digestión anaerobia (Antonopoulou et al., 2008, Venetsaneas et al., 2009, Kisielewska, 2012).

### **2.4.3. Sistemas de dos etapas**

La separación de la etapa de acidogénesis y metanogénesis, empleando procesos anaerobios de dos etapas se presenta como una alternativa apropiada para el tratamiento de lactosuero. Hay varios trabajos publicados que se enfocan hacia el aprovechamiento tanto de la producción de biogás como de H<sub>2</sub>. Sin embargo, la mayoría se centran en añadir una primera etapa para mejorar el rendimiento de producción de biogás sin orientarse a la producción de hidrógeno en la primera etapa de acidogénesis.

Yilmazer et al. (1999) utilizaron un reactor tipo CSTR para la acidificación y un fitro anaerobio para la metanogénesis. Aplicando un TRH de 24 horas en el primer reactor, se alcanzó una acidificación del 50%. Posteriormente, en el reactor metanogénico con un TRH de 4 días, se eliminó un 90% del contenido en DQO con una producción de biogás de 0.55 m<sup>3</sup>/kg DQO.

Por otra parte Gannoun et al. (2008) acidificaron el lactosuero en presencia de *Lactobacillus paracasei* durante 20 horas. Posteriormente, el efluente se neutralizó y se trató en un reactor UAF. Estos autores, operando con un TRH de 2 días y cargas orgánicas de hasta 4 g DQO/L d alcanzaron una tasa de eliminación de DQO comprendida entre el 80-90%, acompañada de un rendimiento de producción de metano de 280 L/kg DQO.

Empleando un sistema de dos fases, compuesto por dos reactores tipo CSTR que incorpora una unidad de filtración de membrana para la recirculación en la segunda

etapa, se consiguió operar con cargas de hasta 19,8 g DQO/L d con un eliminación de DQO del 79% (Saddoud et al., 2007).

Diamantis et al. (2014) evaluaron un sistema de dos fases compuesto de un reactor CSTR para la acidificación, seguido de un reactor UASB para la metanización. Estos autores alcanzaron conversiones de biomasa de hasta un 90% con rendimientos de producción de metano de  $0,37 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{eliminado}}$ .

La evaluación de un sistema con producción diferenciada tanto de  $\text{H}_2$  como de biogás ha sido evaluada por varios autores. Antonopoulou et al. (2008) estudiaron la digestión anaerobia de lactosuero en dos etapas empleando un reactor CSTR para la producción de  $\text{H}_2$  y un reactor PABR (siglas en inglés de “periodic anaerobic baffled reactor”) para la generación de metano, alcanzando una eliminación de la DQO del 94% para un TRH de 4 días.

Venetseneas et al. (2009) evaluaron la influencia del pH durante la fase acidogénica. Los mejores resultados se obtuvieron operando con un TRH de 24 horas y corrigiendo el pH del sistema acidogénico mediante la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Se detectaron rendimientos máximos de producción de  $\text{H}_2$  de  $0,78 \text{ mol H}_2/\text{mol glucosa consumida}$ . El efluente de esta primera etapa, fue introducido en un reactor metanogénico en condiciones de TRH de 20 días alcanzando una producción de  $6,7 \text{ L CH}_4/\text{L alimentación}$ , con una eliminación global de DQO del 95,3%.

Kisieleska (2012) evaluó el funcionamiento de un sistema de 2 fases compuesto por 2 reactores UASB con un volumen de 4,5 L cada uno para el tratamiento de permeado de lactosuero por ultrafiltración. La producción de  $\text{H}_2$ , operando con un TRH de 12 h, carga orgánica 20 g DQO/L d, alcanzó un valor de 0,97 L/d mientras que el tratamiento del efluente en un reactor metanogénico con un TRH 3 días (carga orgánica 2 g DQO/L d) produjo  $2,2 \text{ L CH}_4/\text{d}$ . Con esta configuración se consigue una eliminación global de DQO del 95%.

Tabla.2.4. Trabajos de producción de H<sub>2</sub> en régimen discontinuo

Sustrato	Inóculo	Temperatura (°C)	Rendimiento producción H <sub>2</sub>	Referencia
<b>Lactosuero diluido</b>	<i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i>	30	7,9 mmol/g lactose	(Ferchichi et al., 2005)
<b>Lactosuero en polvo</b>	Cultivo mixto	35	8-10 mmol/g DQO alim	(Yang et al., 2007)
<b>Lactosuero en polvo</b>	Cultivo mixto	37	3,1 mol H <sub>2</sub> /mol lactosa	(Davila-Vazquez et al., 2008)
<b>Lactosuero en polvo</b>	Cultivo mixto	37	1,8 mol H <sub>2</sub> / mol lactosa	(Davila-Vazquez et al., 2011)
<b>Lactosuero en polvo</b>	Cultivo mixto	35	0,89 mol H <sub>2</sub> / mol lactosa	(Kargi et al., 2012b)
<b>Lactosuero en polvo</b>	Cultivo mixto	55	1,55 mol H <sub>2</sub> / mol lactosa	(Kargi et al., 2012b)
<b>Lactosuero en polvo</b>	<i>Escherichia coli W3110 ΔhycA</i>	37	2,74 mol H <sub>2</sub> mol lactosa	(Rosales-Colunga et al., 2010)
<b>Lactosuero diluido</b>	<i>E. aerogenes MTCC 2822</i>	30	0,77-3,50 mol H <sub>2</sub> mol/lactosa	(Rai et al., 2012)
<b>Lactosuero diluido</b>	Cultivo mixto	55	1,57 mol H <sub>2</sub> / mol glucosa	(Azbar et al., 2009a)

**Tabla.2.5.** Trabajos de producción de H<sub>2</sub> a partir de lactosuero

Tipo de reactor	Inóculo	Temperatura (°C)	Carga Orgánica	Rendimiento producción H <sub>2</sub>	Referencia
<b>CSTR</b>	Cultivo mixto	35	5-12 g DQO/L d	1,8-2,3 mmol H <sub>2</sub> /g DQO	(Yang et al., 2007)
<b>CSTR</b>	Cultivo mixto	55	21-47 g DQO/L d	5-22 mmol /g DQO	(Azbar et al., 2009b)
<b>CSTR</b>	Cultivo mixto	37	138,6 g lactosa/L d	2,8 mol H <sub>2</sub> /mol lactosa	(Davila-Vazquez et al., 2009)
<b>UASB</b>	Cultivo mixto	30	20 g DQO/L d	0,3 mmol/g DQO	(Castelló et al., 2009)
<b>UASB</b>	Cultivo mixto.Pret. Térmico	22-25	20 g DQO/L d	0,8 mmol/g DQO	(Carrillo-Reyes et al., 2012)
<b>Reactor lecho empaquetado (polietileno)</b>	Cultivo mixto (fermentación propio lactosuero)	30	37 g DQO/L d	0,668 mol H <sub>2</sub> /mol lactosa	(Perna et al., 2013)
<b>CSTR</b>	Cultivo mixto (fermentación propio lactosuero)	35	-	1,8 mol H <sub>2</sub> /kg DQO	(Antonopoulou et al., 2008)
<b>CSTR</b>	Cultivo mixto (fermentación propio lactosuero)	35	60 g DQO/L d	0,78 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	(Venetsaneas et al., 2009)
<b>UASB</b>	Cultivo mixto.Pret. Térmico	35	20 g DQO/L d	0,49 mmol/g DQO	(Kisielewska , 2012)

## 2.5. OBJETIVOS Y PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO

### 2.5.1. *Objetivo general*

En el capítulo anterior se planteó la problemática que presenta la gestión de lactosuero. Por una parte, los problemas de contaminación derivados de su vertido sin tratamiento o la necesidad de implantar sistemas que permitan su aprovechamiento y valorización. De esta manera, el trabajo está enfocado en el tratamiento biológico de lactosuero para la obtención de biocombustibles como el biogás o el hidrógeno.

### 2.5.2. *Objetivos específicos*

Los trabajos que se han desarrollados en esta tesis se han realizado con el fin de dar respuesta a los siguientes objetivos:

- Estudio de la digestión anaerobia de lactosuero en régimen mesofílico y termofílico semi-continuo y su utilización como co-sustrato en sistema de digestión de lodos EDAR. Evaluación del comportamiento del proceso en reactores convencionales y sistemas con acumulación de biomasa a escala de laboratorio.
- Estudio de la utilización de membranas cerámicas de microfiltración para la evaluación del ensuciamiento a diferentes flujos de alimentación y presión transmembrana para su posible aplicación en el tratamiento de efluentes del proceso de digestión anaerobia de lactosuero.
- Estudio del proceso de digestión anaerobia de lactosuero en dos etapas para la producción de hidrógeno – biogás y la evaluación de las modificaciones de las estructuras orgánicas del sustrato durante el tratamiento mediante la aplicación de espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$  NMR)

### ***2.5.3. Línea de actuación del trabajo experimental***

- En el capítulo 3 se describen los sustratos e inóculos utilizados en la tesis así como los equipos y métodos analíticos utilizados en los ensayos.
- En el capítulo 4 se presentan los resultados de los ensayos de digestión anaerobia de lactosuero en régimen mesofílico.
- En el capítulo 5 se describen los ensayos llevados a cabo con membranas cerámicas de microfiltración para evaluar la influencia del ensuciamiento.
- En el capítulo 6 se exponen los ensayos de fermentación oscura en un reactor empaquetado.
- En el capítulo 7 se desarrollan los experimentos de digestión en régimen termofílico y las pruebas en dos etapas para la producción de hidrógeno y biogás. En este capítulo también se incluye el estudio de las modificaciones de las estructuras orgánicas mediante la aplicación de FTIR y <sup>1</sup>HNMR.
- En el capítulo 8, se describen las pruebas de co-digestión de lactosuero con lodo de EDAR en régimen mesofílico y termofílico.
- El trabajo finaliza con las conclusiones generales en el capítulo 9.



**(Capítulo 3)**

**MATERIAL Y MÉTODOS**

- Caracterización de los residuos e inóculos
- Métodos analíticos y parámetros analizados

**(Capítulo 4)**

**ENSAYOS DE DIGESTIÓN**

**ANAEROBIA DE LACTOSUERO EN RÉGIMEN MESOFÍLICO.**

- Caracterización del sustrato
- Evaluación del potencial de producción de biogás
- Evaluación de la producción en semi-continuo. Reactor convencional y sistemas de acumulación de biomasa.
- Aplicación de membranas de microfiltración para el tratamiento del efluente.

**(Capítulo 5)**

**ENSAYOS CON MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN CERÁMICAS.**

- Evaluación del ensuciamiento provocado por la materia orgánica natural.
- Influencia de parámetros de operación de la membrana. Flujo de alimentación y presión transmembrana.

**(Capítulo 6)**

**ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN UN REACTOR DE LECHO EMPAQUETADO**

- Caracterización del sustrato
- Evaluación de la producción en semi-continuo.
- Estudio microbiológico

**(Capítulo 7)**

**ENSAYOS EN PLANTA PILOTO. DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LACTOSUERO EN RÉGIMEN TERMOFÍLICO. SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y BIOGÁS EN 2 ETAPAS**

- Caracterización del sustrato
- Evaluación de la producción en semi-continuo en planta piloto
- Análisis de las transformaciones de la materia orgánica FTIR,  $^1\text{H NMR}$

**(Capítulo 8)**

**ENSAYOS DE CO-DIGESTIÓN DE LACTOSUERO CON LODOS DE EDAR**

- Caracterización de los sustratos
- Evaluación del potencial de producción de biogás en régimen mesofílico y termofílico

**(Capítulo 9)**

**CONCLUSIONES GENERALES**

*Figura 2.4. Esquema general del trabajo*

## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, T., Tauseef, S.M., Abbasi, S.A., 2012. Anaerobic digestion for global warming control and energy generation—An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 3228-3242.
- Albuquerque, J.A., de la Fuente, C., Bernal, M.P., 2012. Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. *Agric. , Ecosyst. Environ.* 160, 15-22.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1992). Effects of free long fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 37 (6), pag., 808-812
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: Effect of temperature. *Water Res.* 28, 727-731.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M., Wrenn, B.A., Domínguez-Espinosa, R., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22, 477-485.
- Ahn J.H, Do T.H, Kim S.D, Hwang S., 2006. The effect of calcium on the anaerobic digestion treating swine wastewater. *Biochem Eng J* 30, 33–38.
- Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2008. Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process. *Ind Eng Chem Res* 47, 5227-5233.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreève, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* 34, 755-781.
- Azbar, N., Dokgöz, F.T., Keskin, T., Eltem, R., Korkmaz, K.S., Gezgin, Y., Akbal, Z., Öncel, S., Dalay, M.C., Gönen, Ç., Tutuk, F., 2009a. Comparative evaluation of bio-hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. *International Journal of Green Energy* 6, 192-200.

- Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F.T., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M., 2009b. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *Int J Hydrogen Energy* 34, 7441-7447.
- Banik, G.C., Daguet, R.R., 1997. ASBR treatment of low strength industrial wastewater at psychrophilic temperatures. *Water Science and Technology* 36, 337-344.
- Bashir B, Asif M. 2005. Combined effect of calcium and magnesium on sodium toxicity in anaerobic treatment processes. *Electron J Environ, Agric Food Chem* 4, 926–932.
- Bertin, L., Grilli, S., Spagni, A., Fava, F., 2013. Innovative two-stage anaerobic process for effective codigestion of cheese whey and cattle manure. *Bioresour. Technol.* 128, 779-783.
- Boušková, A., Dohányos, M., Schmidt, J.E., Angelidaki, I., 2005. Strategies for changing temperature from mesophilic to thermophilic conditions in anaerobic CSTR reactors treating sewage sludge. *Water Res.* 39, 1481-1488.
- Buffiere, P., Loisel, D., Bernet, N., Delgenes, J.-., 2006. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Science and Technology* 53, 233-241.
- Bustamante, M.A., Albuquerque, J.A., Restrepo, A.P., de la Fuente, C., Paredes, C., Moral, R., Bernal, M.P., 2012. Co-composting of the solid fraction of anaerobic digestates, to obtain added-value materials for use in agriculture. *Biomass Bioenergy* 43, 26-35.
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2012. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *Int J Hydrogen Energy* 37, 5591-5601.
- Castelló, E., García y, S., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C., 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrogen Energy* 34, 5674-5682.

- Chatzipaschali, A.A., Stamatis, A.G., 2012. Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *Energies* 5, 3492-3525.
- Comino, E., Riggio, V.A., Rosso, M., 2012. Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey. *Bioresour. Technol.* 114, 46-53.
- Dávila-Vázquez, G., Razo-Flores, E., 2007. Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas. *Biotecnología* 11, 19-27.
- Davila-Vázquez, G., Alatraste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int J Hydrogen Energy* 33, 4989-4997.
- Davila-Vázquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2009. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *Int J Hydrogen Energy* 34, 4296-4304.
- Davila-Vázquez, G., de León-Rodríguez, A., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2011. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass Bioenergy* 35, 3174-3181.
- Demirel, B., Yenigun, O., Onay, T.T., 2005. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *Process Biochemistry* 40, 2583-2595.
- Diamantis, V.I., Kapagiannidis, A.G., Ntougias, S., Tataki, V., Melidis, P., Aivasidis, A., 2014. Two-stage CSTR–UASB digestion enables superior and alkali addition-free cheese whey treatment. *Biochem. Eng. J.* 84, 45-52.
- Ergüder, T.H., Tezel, U., Güven, E., Demirer, G.N., 2001. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Manage.* 21, 643-650.

- Fang, C., Boe, K., Angelidaki, I., 2011. Anaerobic co-digestion of desugared molasses with cow manure; focusing on sodium and potassium inhibition. *Bioresour. Technol.* 102, 1005-1011.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G., Hintz, W., Almadidy, A., 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J. Biotechnol.* 120, 402-409.
- Fernández, J., Pérez, M., Romero, L.I., 2008. Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Bioresour. Technol.* 99, 6075-6080.
- Fricke, K., Santen, H., Wallmann, R., Hüttner, A., Dichtl, N., 2007. Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. *Waste Manage.* 27, 30-43.
- Gannoun, H., Khelifi, E., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M., 2008. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. *Bioresour. Technol.* 99, 6105-6111.
- Gavala, H.N., Kopsinis, H., Skiadas, I.V., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 1999. Treatment of Dairy Wastewater Using an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *J. Agric. Eng. Res.* 73, 59-63.
- Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidaki, I., Mavris, V., 2007. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renewable Energy* 32, 2147-2160.
- Göblös, S., Portörő, P., Bordás, D., Kálmán, M., Kiss, I., 2008. Comparison of the effectivities of two-phase and single-phase anaerobic sequencing batch reactors during dairy wastewater treatment. *Renewable Energy* 33, 960-965.
- González, M.I., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour. Technol.* 57, 1-11.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int J Hydrogen Energy* 35, 10660-10673.

- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* 27, 1185-1193.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Res.* 32, 5-12.
- Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int J Hydrogen Energy* 32, 172-184.
- Kalyuzhnyi, S.V., Martinez, E.P., Martinez, J.R., 1997. Anaerobic treatment of high-strength cheese-whey wastewaters in laboratory and pilot UASB-reactors. *Bioresour. Technol.* 60, 59-65.
- Kan, E., 2013. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. *Renewable Energy* 49, 227-231.
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569-582.
- Kargi, F., Eren, N.S., Ozmihci, S., 2012a. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. *Int J Hydrogen Energy* 37, 8338-8342.
- Kargi, F., Eren, N.S., Ozmihci, S., 2012b. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 37, 2260-2266.
- Kavacik, B., Topaloglu, B., 2010. Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biomass Bioenergy* 34, 1321-1329.
- Kayhanian, M., Rich, D., 1995. Pilot-scale high solids thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste with an emphasis on nutrient requirements. *Biomass Bioenergy* 8, 433-444.

- Kim, J., Park, C., Kim, T., Lee, M., Kim, S., Kim, S., Lee, J., 2003. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95, 271-275.
- Kisielewska , M., 2012. Feasibility of Bioenergy Production from Ultrafiltration Whey Permeate Using the UASB Reactors, in Kumar, S. (Ed.), *Biogas*.
- Lee, D.H., Behera, S.K., Kim, J.W., Park, H., 2009. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: A lab-scale study. *Waste Manage.* 29, 876-882.
- Levin, D.B., Pitt, L., Love, M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy* 29, 173-185.
- Lo, K.V., Liao, P.H., 1989. Anaerobic-aerobic biological treatment of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biological Wastes* 28, 91-101.
- Long, J.H., Aziz, T.N., Reyes III, F.L.d.l., Ducoste, J.J., 2012. Anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease (FOG): A review of gas production and process limitations. *Process Saf. Environ. Prot.* 90, 231-245.
- Malaspina, F., Cellamare, C.M., Stante, L., Tilche, A., 1996. Anaerobic treatment of cheese whey with a downflow-upflow hybrid reactor. *Bioresour. Technol.* 55, 131-139.
- Malaspina, F., Stante, L., Cellamare, C.M., Tilche, A., 1995. Cheese whey and cheese factory wastewater treatment with a biological anaerobic—aerobic process. *Water Science and Technology* 32, 59-72.
- Massé, D.I., Droste, R.L., 2000. Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 34, 3087-3106.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P., 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour. Technol.* 74, 3-16.
- McCarthy P.L., McKinney R.E., 1961. Salt toxicity in anaerobic digestion. *J. Water Pollut. Control Fed.* 33, 399-408.

- Mockaitis, G., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Zaiat, M., Foresti, E., 2006. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. *J. Environ. Manage.* 79, 198-206.
- Moreno, R., Gómez, X., 2012. Dark Fermentative H<sub>2</sub> Production from Wastes: Effect of Operating Conditions. *Journal of Environmental Science and Engineering 1A*, 936-950.
- Mu, Y., Wang, G., Yu, H., 2006. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 905-913.
- Najafpour, G.D., Hashemiyeh, B.A., Asadi, M., Ghasemi, M.B., 2008. Biological Treatment of Dairy Wastewater in an Upflow Anaerobic Sludge-Fixed Film Bioreactor. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 4, 251-257.
- Nallathambi Gunaseelan, V., 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass Bioenergy* 13, 83-114.
- Onodera, T., Sase, S., Choeisai, P., Yoochatchaval, W., Sumino, H., Yamaguchi, T., Ebie, Y., Xu, K., Tomioka, N., Mizuochi, M., Syutsubo, K., 2013. Development of a treatment system for molasses wastewater: The effects of cation inhibition on the anaerobic degradation process. *Bioresour. Technol.* 131, 295-302.
- O-Thong, S., Prasertsan, P., Birkeland, N., 2009. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. *Bioresour. Technol.* 100, 909-918.
- Patel, P., Desai, M., Madamwar, D., 1995. Biomethanation of cheese whey using anaerobic upflow fixed film reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 398-399.
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int J Hydrogen Energy* 38, 54-62.



- Powell, N., Broughton, A., Pratt, C., Shilton, A., 2013. Effect of whey storage on biogas produced by co-digestion of sewage sludge and whey. *Environ. Technol.* 34, 2743-2748.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 110, 48-68.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., Patanita, M., Dôres, J., 2013. Pretreated cheese whey wastewater management by agricultural reuse: Chemical characterization and response of tomato plants *Lycopersicon esculentum* Mill. under salinity conditions. *Sci. Total Environ.* 463–464, 943-951.
- Puñal, A., Méndez-Pampín, R.J., Lema, J.M., 1999. Characterization and comparison of biomasses from single- and multi-fed upflow anaerobic filters. *Bioresour. Technol.* 68, 293-300.
- Rai, P., Singh, S.P., Asthana, R.K., 2012. Biohydrogen Production from Cheese Whey Wastewater in a Two-Step Anaerobic Process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1540-1549.
- Redwood, M.D., Paterson-Beedle, M., MacAskie, L.E., 2009. Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: Towards the hydrogen economy. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 8, 149-185.
- Rodgers, M., Zhan, X., Dolan, B., 2004. Mixing Characteristics and Whey Wastewater Treatment of a Novel Moving Anaerobic Biofilm Reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 39, 2183-2193.
- Rosales-Colunga, L., Razo-Flores, E., Ordoñez, L.G., Alatraste-Mondragon, F., De Leon-Rodriguez, A., 2010. Hydrogen production by *Escherichia coli* [ $\Delta$ ]hycA [ $\Delta$ ]lacI using cheese whey as substrate. *Int J Hydrogen Energy* 35, 491-499.
- Saddoud, A., Hassaïri, I., Sayadi, S., 2007. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresour. Technol.* 98, 2102-2108.

- Shilton, A., Powell, N., Broughton, A., Pratt, C., Pratt, S., Pepper, C., 2013. Enhanced biogas production using cow manure to stabilize co-digestion of whey and primary sludge. *Environ. Technol.* 34, 2491-2496.
- Siegert, I., Banks, C., 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochemistry* 40, 3412-3418.
- Spagni, A., Casu, S., Farina, R., 2010. Effect of the organic loading rate on biogas composition in continuous fermentative hydrogen production. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 45, 1475-1481.
- Teplyakov, V.V., Gassanova, L.G., Sostina, E.G., Slepova, E.V., Modigell, M., Netrusov, A.I., 2002. Lab-scale bioreactor integrated with active membrane system for hydrogen production: experience and prospects. *Int J Hydrogen Energy* 27, 1149-1155.
- Van Velsen, A.F.M., 1979. Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations. *Water Res.* 13, 995-999.
- Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L.Y., Rintala, J.A., Lyberatos, G., 2001. Simplified hydrolysis models for the optimal design of two-stage anaerobic digestion. *Water Res.* 35, 4247-4251.
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2009. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour. Technol.* 100, 3713-3717.
- Wang, J., Wan, W., 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy* 34, 799-811.
- Wang, X., Jin, B., Mulcahy, D., 2008. Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. *Int J Hydrogen Energy* 33, 4998-5005.

- Wang, X., Zhao, Y., 2009. A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *Int J Hydrogen Energy* 34, 245-254.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L., 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.* 99, 7928-7940.
- Wijekoon, K.C., Visvanathan, C., Abeynayaka, A., 2011. Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 102, 5353-5360.
- Yan, J.Q., Liao, P.H., Lo, K.V., 1988. Methane production from cheese whey. *Biomass* 17, 185-202.
- Yan, J.Q., Lo, K.V., Liao, P.H., 1990. Anaerobic digestion of cheese whey using an upflow anaerobic sludge blanket reactor: III. Sludge and substrate profiles. *Biomass* 21, 257-271.
- Yang, K., Yu, Y., Hwang, S., 2003. Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. *Water Res.* 37, 2467-2477.
- Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J.A., Benemann, J.R., 2007. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int J Hydrogen Energy* 32, 4761-4771.
- Yenigün, O., Demirel, B., 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry* 48, 901-911.
- Yilmazer, G., Yenigün, O., 1999. Two-phase anaerobic treatment of cheese whey. *Water Science and Technology* 40, 289-295.
- Zhu, B., Gikas, P., Zhang, R., Lord, J., Jenkins, B., Li, X., 2009. Characteristics and biogas production potential of municipal solid wastes pretreated with a rotary drum reactor. *Bioresour. Technol.* 100, 1122-1129.



## *Capítulo 3*

# *Material y métodos*



En este capítulo se describen los sustratos empleados durante los ensayos de digestión anaerobia y fermentación oscura así como la metodología general empleada para la cuantificación de los parámetros analizados en los capítulos 4-8 de esta tesis. Los detalles de la metodología específica utilizada en cada ensayo están descritos en los apartados de material y métodos correspondientes a cada capítulo.

## **3.1. SUSTRATOS EMPLEADOS**

### ***3.1.1. Inóculo***

Durante los ensayos de digestión anaerobia se ha utilizado como inóculo lodo digerido procedente de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) de León (Figura 3.1). Esta instalación trata un caudal promedio de 4 462 m<sup>3</sup>/h (población 185 000 habitantes equivalentes) y sus dos digestores tienen un volumen de 4 000 m<sup>3</sup> operando a una temperatura de 35 °C. La cantidad de metales pesados y micro-elementos del lodo está dentro de los rangos recogidos en la Legislación Española (R.D. 1310/90).

En los ensayos de fermentación oscura se ha utilizado como inóculo pellets de biosólido procedentes de la EDAR de León, la cual cuenta con un sistema de deshidratación y secado térmico. El lodo deshidratado se seca a una temperatura comprendida entre 110-115 °C, alcanzando una concentración en torno al 90% de ST.

Para la realización de las pruebas de co-digestión descritas en el capítulo 8, se empleó lodo digerido de la EDAR de Cáceres. La caracterización general de los dos tipos de lodo se presenta en la Tabla 3.1.

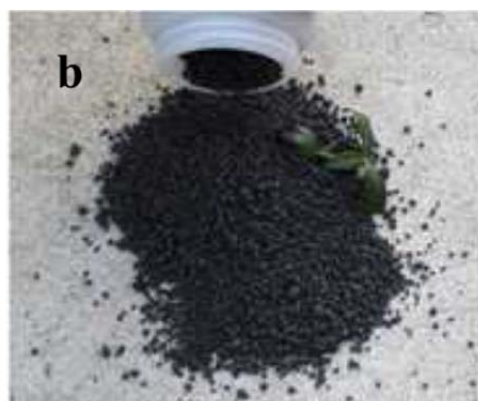
**Tabla 3.1.** Caracterización de los lodos utilizados como inóculo

Parámetro	Lodo digerido <sup>1,a</sup>	Lodo digerido <sup>2,a</sup>
<b>Carbono orgánico (%)</b>	25,9	38,2
<b>Nitrógeno total (%)</b>	5,7	5,3
<b>Relación (C/N)</b>	4,5	4,7
<b>Fósforo total (%)</b>	1,8	0,3
<b>Calcio (%)</b>	1,9	0,3
<b>Magnesio (%)</b>	0,4	0,1
<b>Potasio (%)</b>	0,8	0,7
<b>Sodio (ppm)</b>	460,0	-
<b>Hierro (ppm)</b>	12,3	-
<b>Manganeso (ppm)</b>	133,0	-
<b>Zinc (ppm)</b>	801,0	-
<b>Cobre (ppm)</b>	469,0	-
<b>Boro (ppm)</b>	16,4	-
<b>Mercurio (ppb)</b>	1,8	-
<b>Plomo (ppb)</b>	77,9	97,0
<b>Níquel (ppb)</b>	53,5	31,0
<b>Cadmio (ppb)</b>	790	697
<b>Cromo (ppb)</b>	84,1	22

<sup>1</sup> pruebas digestión

<sup>2</sup> pruebas co-digestión

<sup>a</sup> resultados en base seca



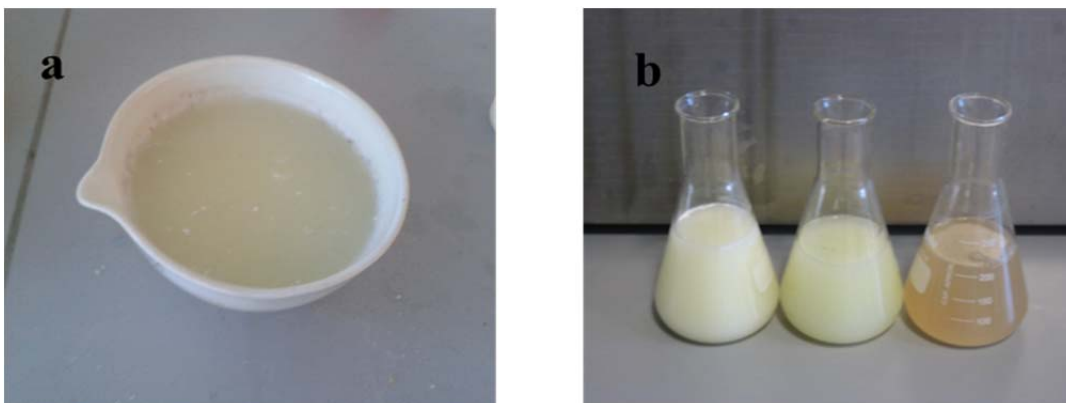
**Figura 3.1.** a) Lodo digerido EDAR, b) Pellets de biosólido



### 3.1.2. Lactosuero

El sustrato principal utilizado es permeado de ultrafiltración de lactosuero procedente de una quesería de Zamora (Figura 3.2). Este producto es un concentrado de lactosa que se obtiene tras someter al lactosuero a un tratamiento mediante membranas enfocado a la recuperación de las proteínas. Las muestras fueron recogidas periódicamente en la quesería y almacenadas a 4 °C hasta su utilización. La caracterización química del lactosuero se presenta en los capítulos de resultados experimentales

Las pruebas de co-digestión se realizaron utilizando lactosuero sin tratar procedente de una quesería de Casar (Cáceres). Se realizaron pruebas de biodegradabilidad en régimen discontinuo con muestras de lactosuero de diferentes queserías de la zona.



*Figura 3.2. a) Permeado de ultrafiltración b) Diferentes muestras de lactosuero pruebas co-digestión.*

## 3.2. ENSAYOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN DISCONTINUO

Los ensayos en discontinuo se realizaron para evaluar el potencial de producción de biogás de los sustratos. En cada reactor se adiciona una cantidad definida de sustrato e inóculo y a lo largo del ensayo se evalúa la generación de biogás. Manteniendo los ensayos operativos hasta el cese de la misma. Estas pruebas se realizan empleando como reactores erlenmeyers de 250 mL sumergidos en un baño termostático a 35 °C y

con agitación (Figura 3.3). Cada reactor está conectado con un medidor de gas por desplazamiento de líquido. Todos los ensayos se realizan por duplicado y se utiliza como blanco un erlenmeyer que contiene sólo el inóculo con el objeto de restar la contribución del inóculo al valor de producción de la muestra. Se utilizan réplicas adicionales para el seguimiento de la evolución de los principales parámetros en la fase líquida.



*Figura 3.3. Imagen de los reactores del montaje de ensayos en discontinuo.*

## 3.3. ENSAYOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN RÉGIMEN SEMI-CONTINUO

### 3.3.1. Banco de reactores de vidrio

La evaluación de los sistemas de producción de gas se llevó a cabo en reactores de tanque agitado (Figura 3.4). En función de las condiciones de cada ensayo se operó en régimen de mezcla completa o con acumulación de biomasa. Cada reactor consiste en un recipiente cilíndrico de vidrio con un volumen de trabajo de 5 L. Están provisto de un sistema de agitación mecánica con agitadores modelo RZR 2020 de la casa Heidolph y constan de un dispositivo para la regulación de la velocidad de agitación. Operan termostatizados a una temperatura de  $35 \pm 1$  °C la cual se mantiene mediante un sistema de baño termostatizado en el que recircula agua caliente a través del encamisado de cada reactor. Para la alimentación en el reactor y retirada de digerido se dispone de bombas peristálticas modelo Dosiper C1R. La alimentación se almacena en un tanque refrigerado con agitación a una temperatura de  $4 \pm 1$  °C.

El gas producido en cada reactor se recoge por una abertura superior y es conducido a un medidor en línea. La medición del volumen de biogás se realiza mediante medidores de desplazamiento de líquido de volumen reversible asociados a contadores de contacto húmedo que registran el conteo en la consola de control. La metodología específica de funcionamiento de estos reactores se describe en el capítulo correspondiente.



*Figura 3.4. Banco de reactores de vidrio*

### **3.3.2. Planta piloto**

La planta piloto utilizada fue diseñada para la producción de biogás en dos etapas, a partir de residuos orgánicos. Dicha planta consta de tres reactores de acero tipo 316 L conectados en serie.

- **Reactor 1:** Se trata de un tanque agitado de 20 L empleado para el almacenamiento de la alimentación. Dispone de una unidad de refrigeración externa tipo HIROSS ICE-005 STD de 2,98 kW que mantiene la temperatura a  $4 \pm 1$  °C.

- **Reactor 2:** Es un reactor con una capacidad de 5 L con agitación mecánica y termostatzado. Se utiliza para el desarrollo de la primera etapa de fermentación para la producción de H<sub>2</sub>. Un circuito externo de calefacción/enfriamiento permite regular la temperatura de operación del reactor. El control de temperatura está gestionado por un controlador digital instalado en el cuadro de control (EUROTHERM 3208) que permite la entrada de agua fría de red o la entrada de agua caliente (procedente de un calentador SIEMENS) al circuito de recirculación de agua de la camisa del reactor. Los gases generados son medidos mediante un caudalímetro de impulsos. El control del pH consta de un electrodo con membrana de vidrio y gel resistente a altas temperaturas (JUMO tecLine for HT).
- **Reactor 3:** Consiste en un reactor de mezcla completa de 30 L con agitación mecánica y termostatzado, donde tiene lugar la segunda etapa de digestión. Un circuito externo de calefacción/enfriamiento, independiente pero análogo al del reactor 2, permite regular la temperatura de operación del reactor. Los gases generados en esta etapa son también medidos mediante un segundo caudalímetro de impulsos.

La temperatura interna de los tres reactores es medida mediante una termorresistencia tipo Pt-100. La agitación es controlada mediante un variador de frecuencia instalado en el cuadro de control. Los tres reactores están instalados en serie. El trasvase de fluido de un reactor al siguiente es realizado mediante un sistema de inyección neumático que consta de una válvula neumática de 3 vías, una jeringa de acero inoxidable de volumen variable (volumen máximo 7,5 mL), una rótula de interconexión entre el vástago de la jeringa y el cilindro y un cilindro neumático para el accionamiento del vástago de la jeringa. La operación de la planta también se puede configurar para que opere como un digestor individual anaerobio mediante la conexión directa del reactor 1 con el reactor 3. En la Figura 3.5 se muestra una imagen de la planta piloto



*Figura 3.5. Planta piloto*

### ***3.3.3. Reactor tubular tipo empaquetado***

Se trata de un reactor tubular fabricado en metacrilato con un diámetro de 92 mm y una altura de 1 700 mm, que opera con un volumen útil de 4 L. La columna dispone de diferentes tomas para la retirada de muestras, digerido, alimentación y recirculación. El reactor está termostatzado mediante un encamisado por el que se recircula agua de calefacción que permite mantener la temperatura a  $35 \pm 1$  °C. La agitación de su contenido se lleva a cabo mediante una recirculación periódica con una bomba peristáltica. Por otra parte, la alimentación se almacena en un tanque con agitación refrigerado a una temperatura de  $4 \pm 1$  °C. Ésta es introducida periódicamente en el reactor mediante una bomba peristáltica. El relleno de este reactor consiste en cubos de espuma de poliuretano con una porosidad de  $0,9 \text{ kg/m}^3$  y un tamaño medio de 3 cm.

### ***3.3.4. Unidad de membrana***

Para la realización de los ensayos se utilizó una unidad de membrana plana (modelo LABCELL-F-1 de Koch Membrane Systems). Está compuesta por un tanque de alimentación con un volumen de trabajo de 500 mL, una bomba, un medidor de

presión y válvulas de seguridad, regulación y drenaje. La superficie efectiva de filtración de la membrana es de 28 cm<sup>2</sup>. Se utilizó una membrana polimérica (Nadir RM-UV 150 T1016) con un tamaño de corte de 150 000 Daltons y que puede operar en un rango de pH 2-10, y una temperatura máxima de 55 °C. La muestra se bombea a través de la membrana a una presión de 1-2 bar, de tal manera que el permeado pasa a través de la membrana y el concentrado es devuelto al tanque de alimentación.



*Figura 3.6. Unidad de membrana*

## 3.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 3.4.1. Nitrógeno total

El nitrógeno total se determinó por el método Kjeldahl (MAPA, 1994). El nitrógeno así cuantificado es la suma del nitrógeno orgánico y el nitrógeno amoniacal. En este método la muestra es digerida con ácido sulfúrico concentrado en un digestor modelo DS-20 de TECATOR a 400 °C durante 35 minutos, lo que produce la transformación del nitrógeno en sulfato amónico. Posteriormente, se alcaliniza el medio y se destila el amoniaco en una unidad de destilación modelo UDK 140 de VELP SCIENTIFICA, recogiénose en un vaso con ácido bórico (4%). El amonio se determina mediante valoración volumétrica con ácido clorhídrico 0,5 N hasta que el pH llegue a 4,8 en un valorador automático modelo 702 SM Titrino de Metrohm.

### **3.4.2. Materia orgánica**

La materia orgánica se determinó siguiendo el método Walkey-Black (MAPA, 1994). Consiste en la oxidación de la materia orgánica presente en la muestra por una mezcla de ácido sulfúrico y dicromato potásico 1N. La muestra es digerida durante media hora, para luego realizar una valoración volumétrica, con una disolución de sulfato ferroso amónico 0,5 N (Sal de Mohr), y difenilamina como indicador, para estimar la cantidad de dicromato en exceso que no interviene en la reacción. El carbono orgánico se determina por diferencia entre el dicromato original y el valorado con la sal de Mohr. La materia orgánica oxidable se obtiene indirectamente mediante la consideración de que el 58% de la materia orgánica es carbono orgánico (Primo y Carrasco, 1980).

### **3.4.3. pH**

Las medidas de pH fueron llevadas a cabo directamente mediante un pHmetro CRISON modelo GLP22.

### **3.4.4. Sólidos totales y sólidos volátiles**

Se analizan siguiendo los métodos Estandarizados APHA, (1998). Cada crisol para la determinación de sólidos totales se desecó en un horno-mufla a 105 °C y fue conservado en un ambiente ausente de humedad. Posteriormente se enfriaron en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesaron. A continuación, se añadieron 10 mL de volumen de muestra en cada crisol y se introdujeron en la estufa a 105 °C. Transcurrido un periodo de 24 horas, los crisoles se retiraron de la estufa, se enfriaron en el desecador hasta temperatura ambiente, se pesaron y se anotaron los valores correspondientes para obtener por diferencia de pesada la cantidad de materia seca en la muestra. Para determinar el contenido en sólidos volátiles se procedió a colocar en el interior del horno mufla los crisoles obtenidos en el procedimiento anterior. Se calcinaron durante 60 min a 550 °C dejándolos enfriar posteriormente en el desecador hasta temperatura ambiente. La diferencia de peso permitió determinar el contenido en sólidos volátiles.

#### **3.4.5. Demanda química de oxígeno (DQO)**

Se utilizó la metodología propuesta en los métodos Estandarizados APHA, 1998. Se realizó la digestión de las muestras con exceso de dicromato potásico en un medio fuertemente ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), durante dos horas a 150 °C en un reactor Hanna C9800. La reacción es catalizada por sulfato de plata ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ). Transcurrida la digestión, el exceso de dicromato se valoró con sal de Mohr, sulfato ferroso amónico ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) mediante un valorador 862 Compact titrosampler (Metrohm) con un electrodo de anillo de oro combinado acoplado (Metrohm).

#### **3.4.6. Amonio**

El nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) se analizó siguiendo el Método Estandarizado (APHA, 1998), a través del método de electrodo selectivo, con un pH-ionómetro 692 de Metrohm AG.

#### **3.4.7. Alcalinidad**

La alcalinidad de un líquido es su capacidad para neutralizar ácidos y constituye la suma de todas sus bases titulables. Para calcular la alcalinidad fueron tomados 5 mL de la muestra homogeneizada, previamente centrifugada 5 minutos a 5 100 rpm, y posteriormente fueron diluidos a 50 mL con agua destilada. La muestra así preparada fue valorada con HCl 0,2 N hasta pH 4,3 mediante un valorador 862 Compact titrosampler (Metrohm) con un electrodo combinado de vidrio AquatrodePlus con Pt 100 acoplado (Metrohm).

#### **3.4.8. Cromatografía de gases**

La composición del biogás producido y la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y de etanol en el medio de reacción fueron analizadas por cromatografía de gases. Todos los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 GC, equipado con un detector de conductividad térmica (TCD).



#### **3.4.8.1. Composición del gas**

Para el análisis de la composición de gas se empleó una columna de 4 m de longitud HayeSep Q 80/100 seguida de una columna de tamiz molecular de 1 m de longitud Molecular Sieve 13 x 80/100 Mesh (1,0 m x 1/8'' x 2,0 m). Las columnas separan CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. El gas portador es helio y se opera a 331kPa y a una temperatura de 50 °C.

#### **3.4.8.2. Ácidos grasos volátiles**

El contenido en AGV (C2-C7) se determinó en el anterior cromatógrafo de gas utilizando el automuestreador (Varian chrompack 8 200 autosampler), el cual está equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar Nukol (30 m x 0,25 mm x 0,25 m) de Supelco. Las muestras de AGVs se prepararon mediante centrifugado a 3 500 rpm durante un tiempo condicionado por el tipo de muestra y filtrando el sobrenadante con filtros de celulosa de 0,45 µm.

La temperatura del inyector y del detector fueron 200 y 250 °C respectivamente. La temperatura del horno fue de 150 °C durante los 3 minutos iniciales, incrementándose posteriormente hasta 180 °C. Se utilizó helio como gas portador. La calibración se llevó a cabo con una mezcla de AGV de Supelco para análisis de ácidos grasos C2-C7. El límite de detección fue de 5,0 mg/L.

#### **3.4.8.3. Alcoholes**

El etanol fue determinado en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL equipado con un automuestreador, con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de sílica fundida de pared recubierta (WCOT, Wall Coated Open Tubular) suministrada por Varian (50 m x 0,25 mm con recubrimiento CP-WAX 57CB DF 0,2). El gas portador empleado fue helio a un flujo de 1 mL/min (presión de 27 psi).

La temperatura del inyector y del detector fue en ambos casos 250 °C. La temperatura del horno fue mantenida a 60 °C durante 2 minutos y después fue incrementada, a razón de 5 °C/min hasta 180 °C durante 8 min. El sistema fue calibrado utilizando ciclohexanona como patrón interno en una concentración 10mM. El disolvente empleado para la preparación de los estándares fue agua. Las muestras fueron previamente centrifugadas (10 min, 3 500 rpm) y el sobrenadante filtrado con filtros de celulosa de 0,45 µm.

#### **3.4.9. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La lactosa y el ácido láctico fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, “high-performance liquid chromatography”) Alliance 2690 (Waters, MA, EEUU) equipado con un sistema de inyección de muestra y de impulsión de la fase móvil y con un detector de índice de refracción 2 414 de Waters. La columna utilizada fue PL Hi-Plex H 8mm, suministrada por Varian (300 mm x 7,7 mm). También fue utilizada una precolumna PL Hi-Plex H Guard, suministrado por Varian (50 mm x 7,7 mm). Ambas formadas a base de resina monodispersa para análisis de carbohidratos (relleno monodisperso de estireno sulfonado y copolímero divinilbenzeno de tamaño de partícula 8 µm). La fase móvil consistió en una mezcla formada por 50% de fase A y 50% de fase B, siendo la fase A H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en agua en concentración 0,01M, y la fase B agua. El flujo de la fase móvil fue 0,4 mL/min. Las muestras previamente fueron centrifugadas (20 min, 7 800 rpm) y el sobrenadante filtrado con filtros de celulosa de 0,2 µm. El sistema fue calibrado mediante el método del patrón externo elaborando una curva de calibrado para cada uno de los compuestos analizados, inyectando distintas disoluciones de concentración conocida, empleando agua como disolvente.

#### **3.4.10. Análisis microbiológico**

El análisis de las comunidades bacterianas durante los ensayos de producción de hidrógeno por fermentación oscura fue realizado utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR ,siglas en inglés, “Polymerase chain reaction”) acoplada a

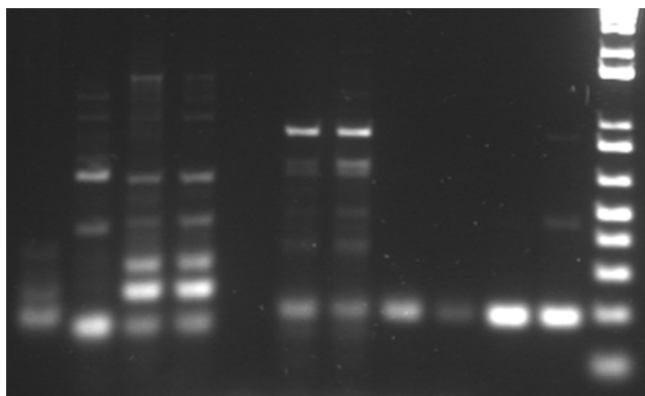
la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE ,siglas en inglés, “Denaturing gradient gel electrophoresis”).

Las muestras se centrifugaron inicialmente para la obtención de un pellet o precipitado y se llevó a cabo posteriormente la extracción mediante un kit comercial “Powersoil<sup>™</sup> DNA Isolation Kit “(Mo Bio Laboratory Inc.). Se realizó una PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) para la amplificación del ADN que codifica para una región de la subunidad 16S del ARNr de entre 150 y 200 pares de bases, utilizando una pareja de cebadores universales para Bacterias:

**UNIV-518r (5'- ATTACCGCGGCTGCTGG-3')** y el **EUB-357f** con una modificación necesaria para la DGGE posterior, que es una adición de una cola GC ó clamp GC: **EUB-357f (G+C) (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG- 3')**. Para la realización de la PCR se utilizó una Master Mix 2X iProof del kit iProof<sup>™</sup> High-Fidelity Master Mix (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del protocolo. Respecto al programa de PCR, se utilizó un programa para tratar de minimizar los anillamientos inespecíficos.

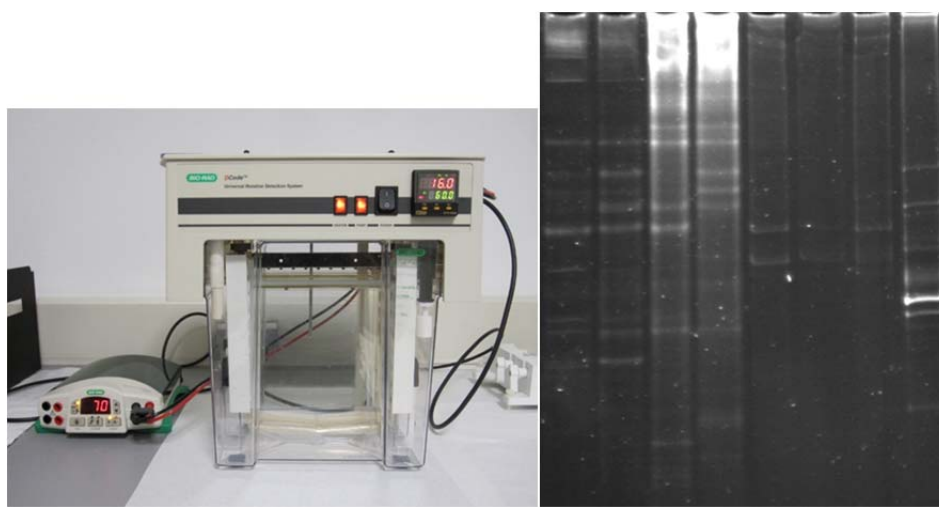
La PCR se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para ello se preparó una solución de 50 mL de tampón TAE 1X en el que se disolvieron 0,5 g de agarosa comercial mediante tratamiento de calor en el microondas. La solución se vertió en un molde en el cual ya estaba el peine de pocillos colocado y se dejó enfriar hasta que solidificó. Una vez solidificado se colocó el molde en la cubeta de electroforesis (con tampón TAE1X) y se cargaron las muestras de la PCR junto con una solución de color (azul de bromofenol) para poder observar el frente de carrera de ADN, seguidamente se aplicó un voltaje para conseguir la migración de ADN a lo largo del gel y su detención en la zona correspondiente al tamaño de banda amplificado.

Una vez finalizada la electroforesis se procedió a la tinción del gel durante una hora mediante una solución de colorante GelRed (Biotium Inc.). Pasado ese tiempo se visualizó el gel en un equipo de análisis de imagen, para verificar la presencia o ausencia de bandas. Si se verifica la presencia de banda, se confirma la presencia de ADN y se procede con el ensayo mediante la realización de la DGGE para analizar poblaciones microbianas mayoritarias basadas en amplificaciones de fragmentos de genes ribosomales, concretamente el gen ribosomal 16S.



*Figura 3.7. Imagen de un gel de agarosa*

Para la aplicación de la técnica DGGE, en primer lugar se prepararon las soluciones desnaturalizantes de urea, formamida, acrilamida y TAE 50X. Seguidamente, se preparó el gel con un gradiente de 40-60% de Urea y formamida y se esperó hasta que polimerizó (2 h aproximadamente). Una vez polimerizado se cargaron las muestras (el resto de volumen de la PCR más azul de bromofenol) en los pocillos del gel, previamente colocado dentro de la cubeta del equipo la cual se rellenó con 7 L de tampón TAE 1X. En ese momento se aplicó un voltaje de 80 V y se dejó correr el ADN durante 13-16 horas. Una vez terminada la electroforesis, se tiñó en una solución de colorante GelRed durante 30-60 minutos. se fotografió en un equipo de análisis de imagen de luz UV, y se cortaron las bandas de interés. El ADN que va inserto en estas bandas se purificó y se utilizó para una nueva PCR previa a la secuenciación, utilizando un programa de “touchdown”, con los cebadores UNIV-518r y EUB-357f, pero este último sin la cola GC, para mejorar el resultado de la amplificación, ya que con la cola GC se producen más anillamientos inespecíficos.



*Figura 3.8. Equipo DGGE e imagen de un gel obtenido tras la DGGE.*

Una vez realizada la nueva reacción de amplificación, el volumen final de ADN amplificado se cargó en el equipo MegaBACE DYEnamic (Amersham biosciences) para su análisis por electroforesis capilar. Los resultados obtenidos de esta electroforesis, que ya son las secuencias del gen buscadas, se chequearon y analizaron utilizando el programa “Chromas LITE” (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente se compararon usando el programa BLAST (“*Basic Local Alignment Search Tool*”) en la base de datos ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) y se identificó el microorganismo con el que corresponde dicha secuencia.

### **3.4.11. FTIR**

El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante un espectrómetro marca Perkin Elmer modelo System 2 000. El espectro FTIR de cada muestra fue registrado entre los  $4\ 000\ \text{cm}^{-1}$  y los  $400\ \text{cm}^{-1}$  de número de onda. El protocolo de preparación y análisis de las muestras se llevó a cabo según ha sido descrito previamente por Cuetos et al. (2009).

La preparación de las muestras para su análisis requirió la elaboración previa de unas pastillas. Para ello, las muestras fueron secadas en una estufa Memmert a  $105 \pm 2\ ^\circ\text{C}$  durante 24 horas y después molidas con un molino de bolas de laboratorio Retsch MM200. Las pastillas se prepararon con 2 mg de cada una de las muestras junto con 200 mg de bromuro potásico. La mezcla se trituroó en un mortero de ágata hasta alcanzar una granulometría muy fina y una perfecta homogeneización. Seguidamente, la muestra fue introducida en una prensa hidráulica Graseby (Specac) donde fue comprimida bajo presión de  $6\ 000\ \text{kg/cm}$  durante 10 minutos. Como resultado se obtuvieron unas pastillas que posteriormente se introdujeron en el espectrómetro. Junto con cada grupo de muestras se preparó y analizó un blanco que consistía en una pastilla elaborada únicamente con 200 mg de KBr.

Para la normalización de los espectros se empleó el procedimiento descrito por Meissi et al. (2007). Consiste en realizar el promedio de los valores de absorbancia del eje de las Y. El valor promedio se resta del espectro, así se hace pasar el eje de las X por la mitad del espectro. Se calcula entonces la suma del cuadrado de los valores de la Y y

el espectro se divide por la raíz cuadrada de esta suma. El análisis de los espectros se realizó con ayuda del software Spectrum y Origin Pro 8.

#### 3.4.12. $^1\text{H}$ NMR

En los análisis de  $^1\text{H}$ NMR se utilizó DMSO $d_6$  como patrón interno. El desplazamiento químico ( $\delta$ ) a 298 K de DMSO $d_6$  está situado en los espectros de  $^1\text{H}$  NMR en torno a 2,49 ppm.

La preparación de las muestras a introducir en el equipo de  $^1\text{H}$ RMN, se realizó tomando 100 mg de muestra que se mezclaron con 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO $d_6$ ). La mezcla se agitó repetidas veces de forma manual durante 2 horas, para poner en contacto la muestra con el disolvente. Posteriormente, ésta se centrifugó a 13 000 rpm durante 3,5 minutos y se extrajeron 600  $\mu\text{L}$  de sobrenadante que fueron depositados en el tubo porta-muestras que fue introducido en el equipo Bruker Avance 600 spectrometer (5mm TCi cryoprobe, de detección inversa). Posteriormente, los espectros se analizaron mediante el programa informático MestRenova.

### 3.5. BIBLIOGRAFÍA

- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, D.C.: USA American Public Health Association/American Water Works Association/ Water Environment Federation; 1998.
- B.O.E. (1990). Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de lodos de depuración del sector agrario. Boletín Oficial del Estado, 1 de noviembre de 1990, 262, pp. 32339-40.
- Cuetos, M., Moran, A., Otero, M., Gomez, X., 2009. Anaerobic co-digestion of poultry blood with OFMSW: FTIR and TG-DTG study of process stabilization. Environmental technology 30, 571-582.

M.A.P.A. (1994), Métodos oficiales de análisis, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Dirección General de Política Alimentaria, Vol. III Madrid, 1994.

Meissl, K., Smidt, E., Schwanninger, M., 2007. Prediction of humic acid content and respiration activity of biogenic waste by means of Fourier transform infrared (FTIR) spectra and partial least squares regression (PLS-R) models. *Talanta* 72, 791-799.

Primo E., Carrasco J.M. (1980). Química agrícola I. Suelos y Fertilizantes. Ed. Alhambra.Madrid. España, 1980.

Saleal, Necso, Pridesa, 2003. E.D.A.R. de León y su Alfoz. Ed. Eje Producciones S.L. León.





## *Capítulo 5*

# *Influence of natural organic matter during tubular microfiltration ceramic membranes operation*



**Abstract**

Natural organic matter (NOM) has been identified as an important fouling precursor during membrane treatment due to accumulation and deposition of particles on the membrane surface. NOM is usually divided into two groups, non-humic and humic substances. Humic substances are abundant in natural waters, raw wastewater or effluents from municipal wastewater treatment plants.

During this work the treatment of humic acid (HA) solutions with a microfiltration ceramic membrane under different transmembrane pressures (TMP) and flowrate (FR) was studied. The addition of salinity and heavy metals (HM) was evaluated to determine the effect over operating conditions.

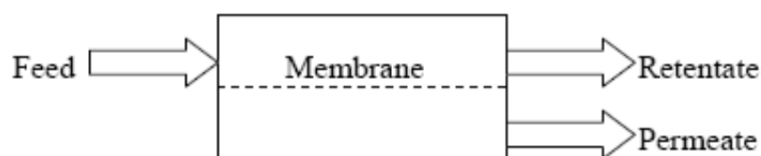
Deposition of HA particles took place and resulted in a significant effect over the fouling behaviour of the membrane unit. As HA concentration was increased, an increase in HA retention was observed along with a decrease in permeate flux. In addition, HA retention increased when additional salinity and heavy metals were added.

## 5.1. INTRODUCTION

### 5.1.1. Membrane technology

Membrane technology which is applied in separation processes in water and wastewater treatments has become increasingly competitive and it is superior to the traditional water treatment technology, with proven performance and process economics (Radjenovic et al., 2008). Reduction in number of processing steps, greater separation efficiency and improved final product quality are the main attractions of these processes (de Morais Coutinho et al., 2009).

A membrane can be essentially defined as a barrier which separates two phases and restricts transport of various chemical species in a selective manner. Transport through a membrane occurs as a consequence of a driving force such as a gradient of concentration, pressure, chemical potential or electrical field. A classification according to the driving force is presented in Table 5.1. The stream that passes through the membrane pores is the permeate, whereas the one rejected is the retentate (Figure 5.1) (Soni et al., 2009).



**Figure 5.1.** Membrane operation (Soni et al., 2009).

The most widely applied membrane separation processes are microfiltration (MF), ultrafiltration (UF), nanofiltration (NF) and reverse osmosis (RO).

During operation, particulates may accumulate on the membrane surface. This deposition on the membrane is termed fouling. Due to membrane fouling, a reduction of permeate flux and an increase in transmembrane pressure takes place. Membrane fouling is an important parameter in the design and operation of membrane systems as it affects pretreatment needs, cleaning requirements, operating conditions, cost, and performance. Several strategies to reduce fouling and improve membrane cleaning have

been proposed. These strategies include development of new membrane materials, new design of membrane module, the modification of feed flow pattern, or incorporation of cleaning regimes (Lim and Bai, 2003).

**Table 5.1.** Classification of membranes and membrane processes (Ulbricht, 2006).

Membrane barrier structure	Trans-membrane gradient		
	Concentration	Pressure	Electrical Field
<b>Non-porous</b>	Pervaporation	Gas separation Reverse Osmosis	Electrodialysis
<b>Microporous <math>d_p \leq 2</math> nm</b>	Dialysis	Nanofiltration	
<b>Microporous <math>d_p = 2-50</math> nm</b>	Diálýsis	Ultrafiltration	Electrodialysis
<b>Microporous <math>d_p = 50-500</math> nm</b>		Microfiltration	

### 5.1.2. Ceramic membranes

Membranes are classified into two main categories according to the material they are made of: Polymeric and ceramic membranes. Ceramic membranes, such as alumina and silica, have been widely used in environmental, petrochemical and food industries because of their higher chemical, thermal and mechanical stability over polymeric membranes (Xu et al., 2006).

Some of the advantages of ceramic membranes are:

- Chemical, mechanical and thermal stability
- Ability of steam sterilisation and backflushing
- High abrasion resistance
- High fluxes
- High durability
- Bacteria resistance
- Possibility of regeneration
- Dry storage after cleaning

The disadvantages are their high weight and the considerable production costs of ceramic components. However, the costs are generally compensated by a long service life (Ogunbiyi, 2008).

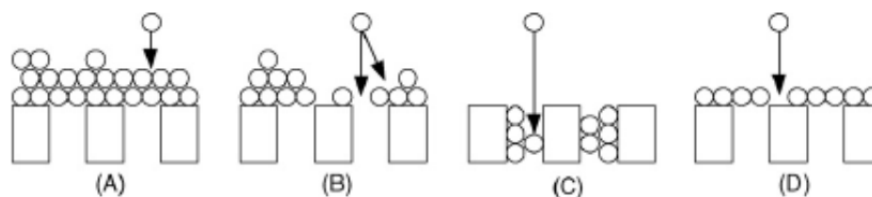
### 5.1.3. Fouling

Membrane filtration processes are prone to fouling, with a progressive decline in membrane flux with time because of the accumulation of retained material. Some of the main drawbacks of fouling are a decrease in water production, an increase in applied pressure required for a constant rate of water production, a gradual membrane degradation which results in a shorter membrane life, and a decrease in the permeate quality that causes significant loss of productivity and added operational cost (Belkacem et al., 2007).

Regarding fouling mechanisms, it is generally recognised that there exist three key varieties:

- **Pore constriction** due to adsorption of filtered species within the membrane pores.
- **Pore blocking** at the membrane surface.
- **Cake formation** by the species rejected by the membrane (Katsoufidou et al., 2005).

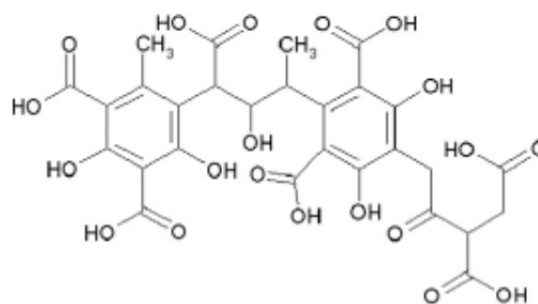
Colloidal material may cause fouling by forming a cake on the membrane surface, while dissolved material may cause fouling by precipitating at the membrane surface or adsorbing within the membrane pore space. In the former two cases the resistance to filtration is related to the permeability of the surface cake, while in the latter case the filtration resistance is related to the effective size of the membrane pores (Carroll et al., 2000).



**Figure 5.2.** A) Cake formation; B) Intermediate blocking; C) standard blocking; D) total blocking (Blankert, et al., 2006).

Natural organic matter (NOM) has been identified as an important fouling precursor for nanofiltration (NF) and reverse osmosis (RO) membranes (Tang et al., 2007). In this way, proper pretreatment of the feeding is needed in order to avoid membrane fouling. Among several possibilities, the introduction of a microfiltration (MF) or ultrafiltration (UF) pretreatment stage are techniques that are increasingly being used for drinking water, seawater and wastewater RO applications (Ebrahim et al., 1997). Although MF pore size are relative large compared to NOMs, MF units are also subject to problems of fouling that arise from the accumulation and deposition of NOMs on the membrane surface (Wang et al., 2010).

NOM of soil, peats and water consists of a mixture of plant and animal products in various stages of decomposition. NOM is usually divided into two groups: non-humic and humic substances. Humic acids (HA) comprise a group of heterogeneous recalcitrant polymeric organics. These acids are abundant in natural waters, raw wastewater, and in effluents from municipal wastewater treatment facilities. HA molecules are composed of both aromatic and aliphatic components. Its typical molecular weight varies from a few thousand to a few hundred thousand Daltons with a great dependence on their sources (Sutzkover et al., 2010).



**Figure 5.3.** Schematic structure of HA molecule (Sutzkover et al., 2010)

During this work the treatment of humic acid solutions with a MF ceramic membrane under different transmembrane pressure (TMP) and flowrate (FR) was studied. The addition of salinity and heavy metals (HM) was evaluated to determine the effect over operating conditions. Permeate fluxes and humic acid retention results were analysed in order to find out the fouling effect.

## 5.2. MATERIALS AND METHODS

### 5.2.1. Testing solutions

Humic acid stock solution of 1 g/L was prepared by dissolving humic acid (Aldrich Chemicals) using deionised water. Diluted solutions of 10 and 30 mg/L were prepared from this stock solution. NaCl (Aldrich Chemicals) was added to obtain the desired salinity level of the tested solutions.

Heavy metals (HM) stock solution of 1 g/L concentration was prepared by dissolving 0.0986g of  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , 0.0967g of  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ , 0.0702 g of  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ , 0.1033 g of  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ , 0.0534g of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , and 0.0712  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  in 200 mL of deionised water. Reactants were obtained from Sigma-Aldrich. During each corresponding test the appropriate amount of heavy metals stock solution was added.

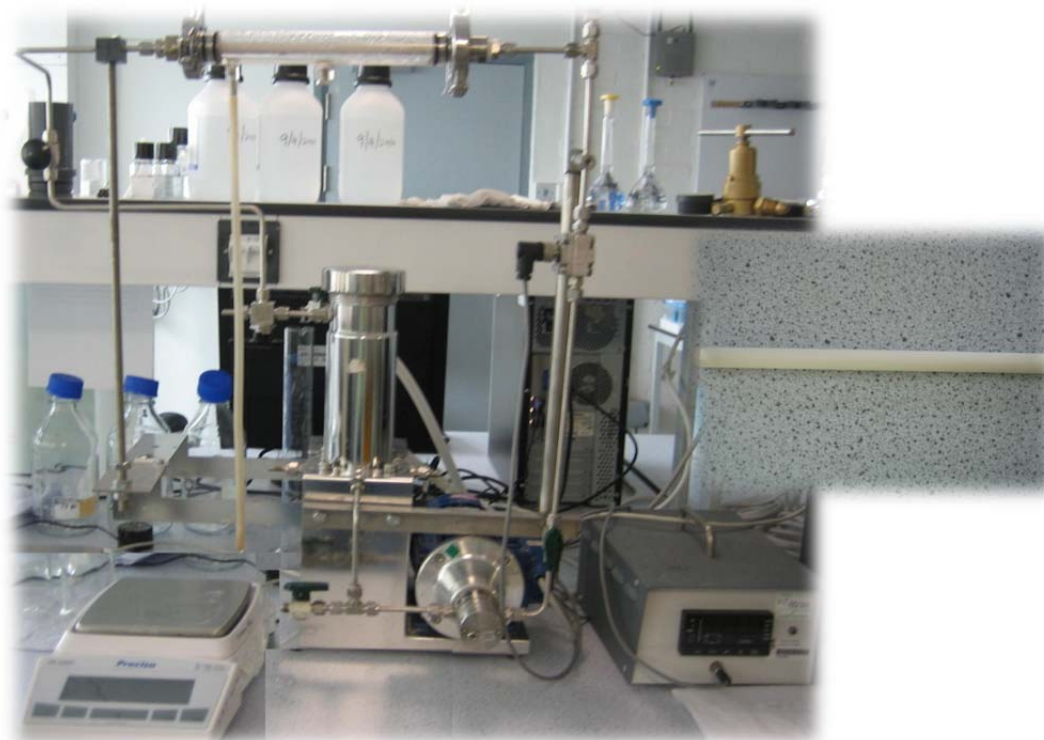
Before each experiment, the solution was stirred using a magnetic stirrer during 1 hour in absence of light. Previous to membrane filtration, pH was adjusted to 7.0 units by the addition of 1 M NaOH or  $\text{HNO}_3$  as needed.

### 5.2.2. Membranes

Tubular ceramic microfiltration membranes were used. They were made of alumina (70%), zirconia (25%) and yttria (5%) with a nominal pore size of 0.5  $\mu\text{m}$ . The overall filtration area produced by the membrane was  $6.28 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ . The membrane unit (Figure 5.4) consists of a process vessel (SS316/SS304) with 500 mL capacity, a gear pump (SS316 /PEEK mod.), a rotameter, valves and a housing that hosts the tubular membrane.



The operating pressure and volumetric flow rate were adjusted using the concentrate outlet and the feeding membrane valves. The allowable flowrate was between 0-3 L/min and the pressure was controlled to be between 1.0 to 2.0 bar. The permeate flux was obtained from the permeate weight measured for a certain time with a balance. Membrane was cleaned after each use passing NaOH (2M), nitric acid (2%) and deionised water through the membrane.



*Figure 5.4. Membrane unit and ceramic tubular membrane detail.*

### **5.2.3. Analytical techniques**

Humic acid concentrations were evaluated spectrophotometrically using a UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer supplied by Shimadzu. The absorbance was measured at a wavelength of 254 nm. The absorption of light at these wavelengths by humic substances is due to both their aromatic rings and conjugated unsaturated bonds and to the presence of free electron pairs on heteroatoms (Kulovaara et al., 1999).

#### 5.2.4. Calculations

Permeate volume flux was calculated in terms of equation 1:

$$J = \frac{V}{At} \quad (1)$$

Where  $J$  is the permeate volume flux  $L/m^2h$ ,  $V$  denotes the volume of permeate (L) collected within time  $t$  (h), and  $A$  indicates the effective membrane surface ( $m^2$ ). Normalised flux is calculated as the ratio of permeate flux ( $J$ ) to the initial flux at the beginning of the filtration ( $J_0$ ).

Observed retention ( $R_{obs}$ ) of humic acids (HA) was calculated as follows (Equation 2) :

$$R_{obs} = 1 - \frac{C_p}{C_b} \quad (2)$$

Where  $R$  is the retention coefficient of HA,  $C_p$  denotes HA concentration in the permeate, and  $C_b$  stands for HA concentration in the bulk solution (Prádanos et al., 1995). Tests were performed in duplicate. A summary of experimental conditions is presented in Table 5.2.

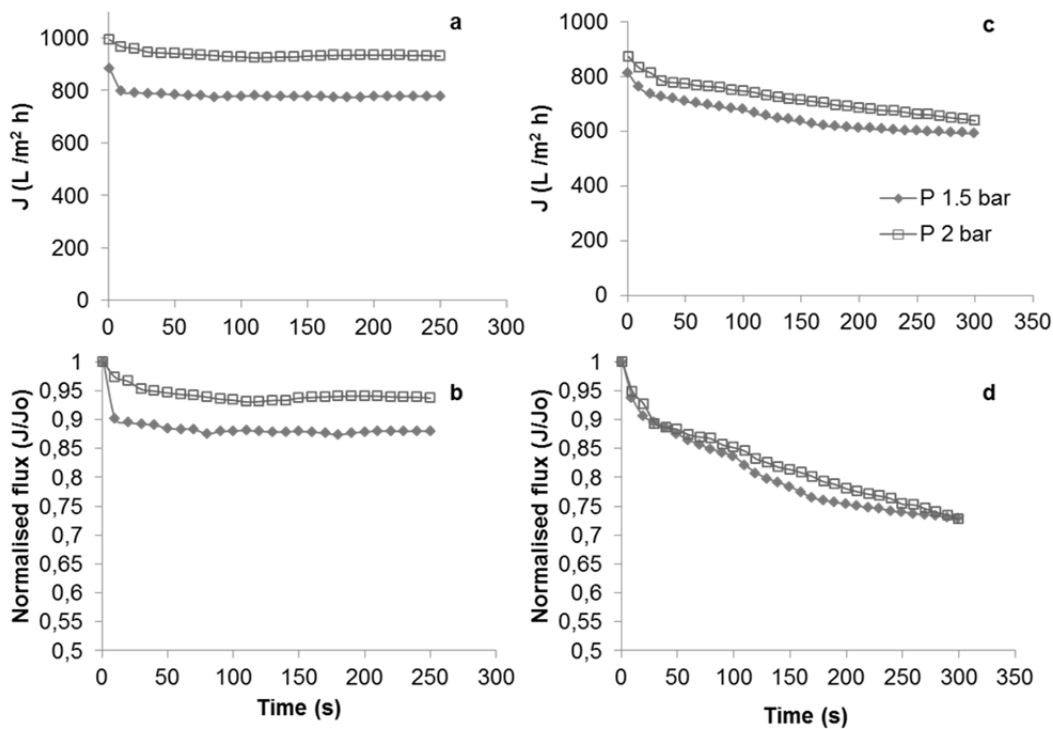
**Table 5.2.** Summary of experiments

Membrane operation conditions		Sample composition		
FR (L/min)	TMP (bar)	HA (mg/L)	NaCl (g/L)	HM (mg/L)
1.5	1.5	10	-	-
1.5	2	10	-	-
2	1.5	10	-	-
2	2	10	-	-
1.5	1.5	30	-	-
1.5	2	30	-	-
2	1.5	30	-	-
2	2	30	-	-
1.5	1.5	10	25	-
1.5	2	10	25	-
2	1.5	10	25	-
2	2	10	25	-
1.5	1.5	30	25	-
1.5	2	30	25	-
2	1.5	30	25	-
2	2	30	25	-
1.5	1.5	10	25	10
1.5	2	10	25	10
2	1.5	10	25	10
2	2	10	25	10
1.5	1.5	30	25	10
1.5	2	30	25	10
2	1.5	30	25	10
2	2	30	25	10

### 5.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 5.3.1. Effect of humic acid (HA) retention

HA retention was studied against transmembrane pressure (TMP) (1.5-2 bar) and flow rate (FR) (1.5-2 L/min) at HA concentrations of 10 and 30 mg/L. Figure 5.5 and Figure 5.6 show the variation of permeate flux and normalised permeate flux during experiments. All trials presented a decline in the permeate flux rate until a relative steady-state is reached. The flux reduction mainly took place during the initial stage of the filtration due to the contact and accumulation of HA particulates in the membrane surface.

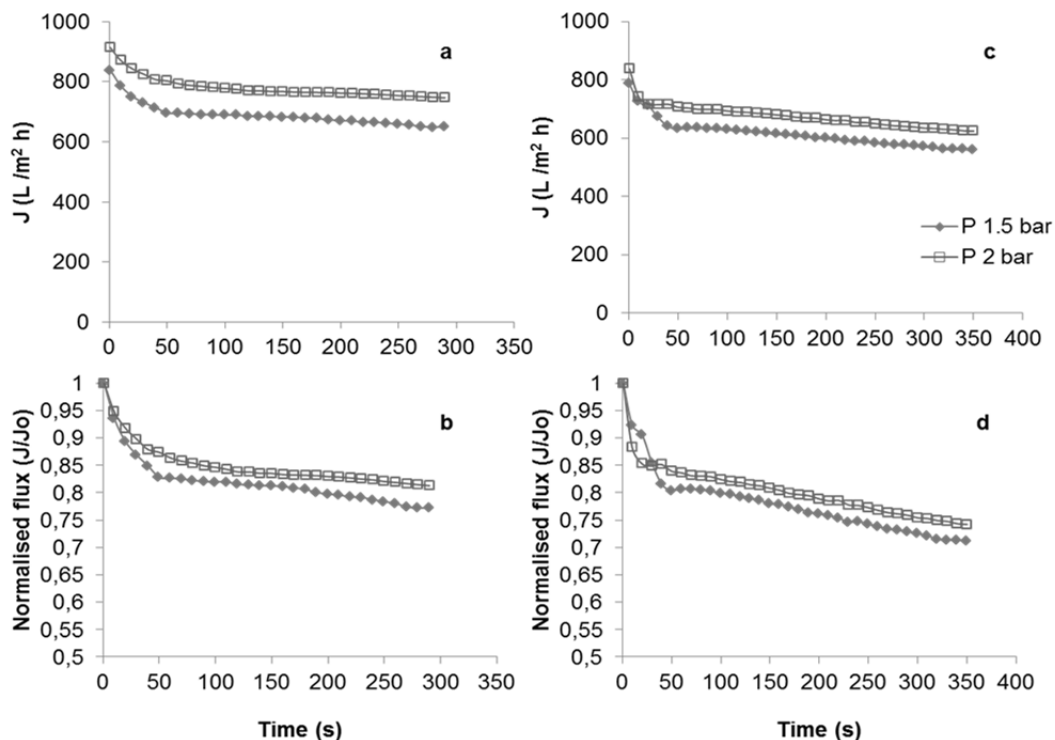


**Figure 5.5.** Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 1.5 L/min. HA concentration of 10 mg/L (a; b) and 30 mg/L (c; d).

The initial step in HA fouling is associated with the convective deposition of HA particles or aggregates on the membrane surface, with this initial deposit accelerating the subsequent deposition of macromolecular HA (Yuan et al., 1999). During the tests with a concentration of 30 mg/L HA, a quite higher reduction of normalised permeate

flux was observed when compared to the experiment performed at 10 mg/L HA at the same FR and TMP conditions. When the TMP was increased to 2 bar, an improvement of normalised permeate flux was observed at both HA concentrations tested. An increase in pressure might have overcome the resistance of the HA layer settled in the membrane surface, allowing more solution to pass through the membrane and resulting in a higher permeate flux.

Furthermore, when the experiments were performed at higher FR, a reduction in permeate flux was observed (Figure 5.6). It has been previously reported that higher FR might favour removal of large particle types present in the feed due to is associated with a more turbulent flow through the membrane (Xu et al., 2010). In this way, only small particle types can form deposits on the membrane surface and this effect leads to the formation of a more compact cake layer structure having increased resistance, which results in the reduction of permeate flux (Xu et al., 2010).



**Figure 5.6.** Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 2 L/min. HA concentration of 10 mg/L (a,b) and 30 mg/L (c,d).

Results of Robs of HA during the experiments are presented in Figure 5.7. When solutions with 10 mg HA/L are used at FR 1.5 L/min, the application of higher pressure favoured a slight reduction in Robs (30.5-28.4%). However, as FR was increased to 2 L/min an increase in Robs was detected under both pressures tested (37.1-32.1%). Employing solutions with 30 mg HA/L, Robs values were increased when comparing to previous tests at 10 mg HA/L, since higher deposition of humic acid particles took place. The highest value of Robs,  $55.04 \pm 4.93\%$ , was measured at P 1.5 bar and FR 2 L/min.

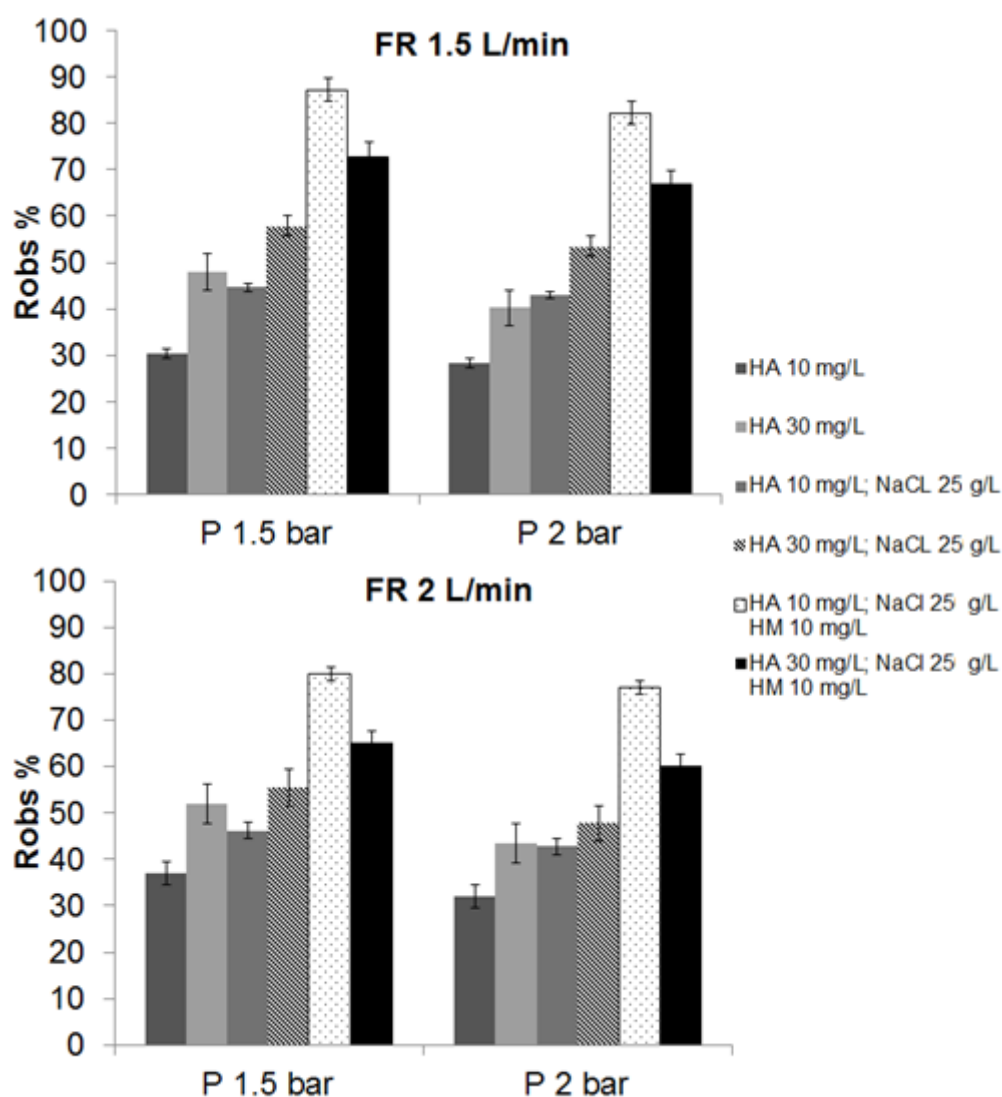
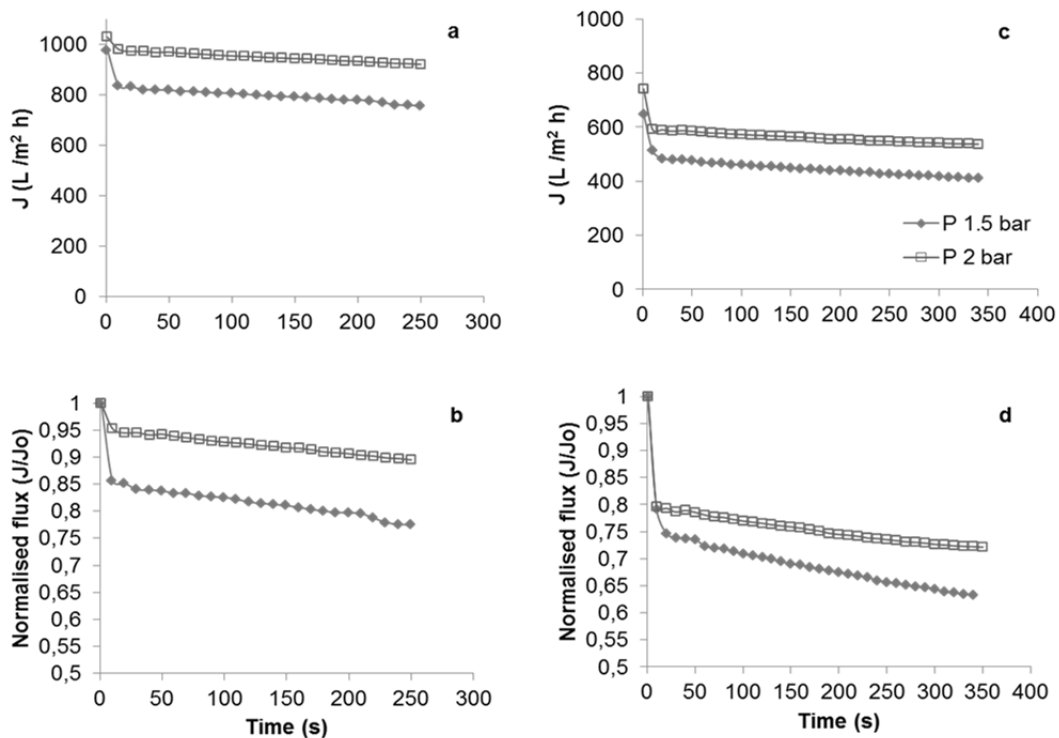


Figure 5.7. HA retention observed during experiments.

### 5.3.2. Effect of salinity

Humic acid retention was studied against TMP (1.5-2 bar) and FR (1.5-2 L/min) at HA concentration of 10 and 30 mg/L supplemented with salinity (25 g NaCl/L). It can be seen that flux curves present a similar trend to results previously reported with humic acids (Figures 5.8-5.9), a decrease in permeate fluxes was appreciated, which was associated to the addition of salinity.

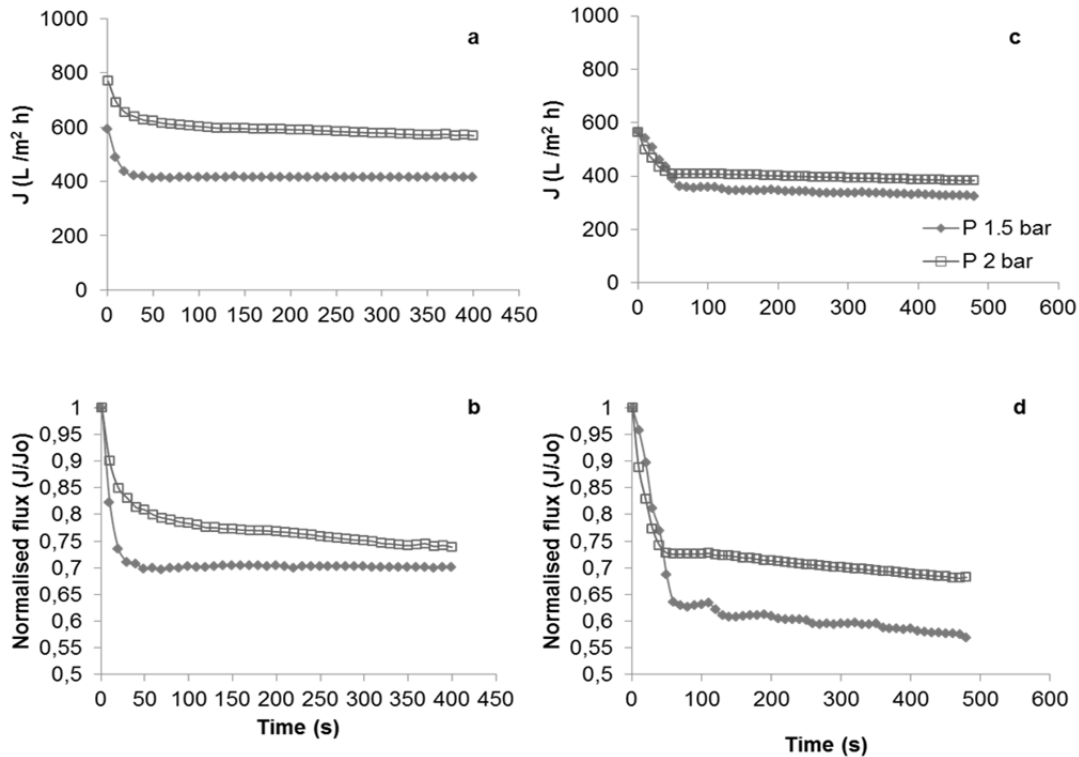


**Figure 5.8.** Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 1.5 L/min. Concentration HA 10 mg/L; NaCl 25 g/L (a, b) and HA 30 mg /L; NaCl 25 g/L (c, d).

The influence of salinity also becomes evident when analysing Robs values. Specially during tests at 10 mg HA/L and FR 1.5 L/min, Robs values were affected by the increase in TMP, resulting in values of 46.5% and 51.6% at TMP of 1.5 and 2 bar respectively (Figure 5.7).

Previous studies showed that salinity content has a significant effect on the fouling behaviour of this kind of systems because HA deposition and aggregation is influenced by electrostatic and hydrophobic interactions (Kulovaara et al., 1999).

Sodium ions ( $\text{Na}^+$ ) are attracted to the area surrounding the anionic HA particles, forming a layer called the diffuse layer. As the salinity increases, more counter-ions are added to the suspension and are attracted towards the HA particles causing the diffuse layer to compress and as a result a more compact layer is formed (Hilal et al., 2008).



**Figure 5.9.** Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 2 L/min. Concentration HA 10 mg/L; NaCl 25 g/L (a, b) and HA 30 mg/L; NaCl 25 g/L (c, d).

### 5.3.3. Effect of salinity and heavy metals

Humic acid retention in presence of salinity (25 g/L) and heavy metals (10 mg/L) was studied against TMP (1.5-2 bar) and FR (1.5-2 L/min) at an HA concentration of 10 and 30 mg/L. Figures 5.11 and 5.12 show that permeate fluxes were reduced as a consequence of heavy metal addition. Higher deposition of particles took place favouring pore blocking and therefore a decrease in permeate passage.

During experiments at 10 mg/L HA, the observed retention increased considerably when results are compared with data from previous experiments treating



HA solutions and HA solutions with additional salinity. Robs reached the highest values of 87.1 and 82.1% when solutions with 10 mg/L were passed through the membrane with a FR of 1.5 L/min at TMP of 1.5 and 2 bar respectively. In the permeate samples it could be visually observed a removal of the characteristic brown colour of humic substances due to its retention (Figure 5.10).



Figure 5.10. Feed solution and permeate samples after membrane operation

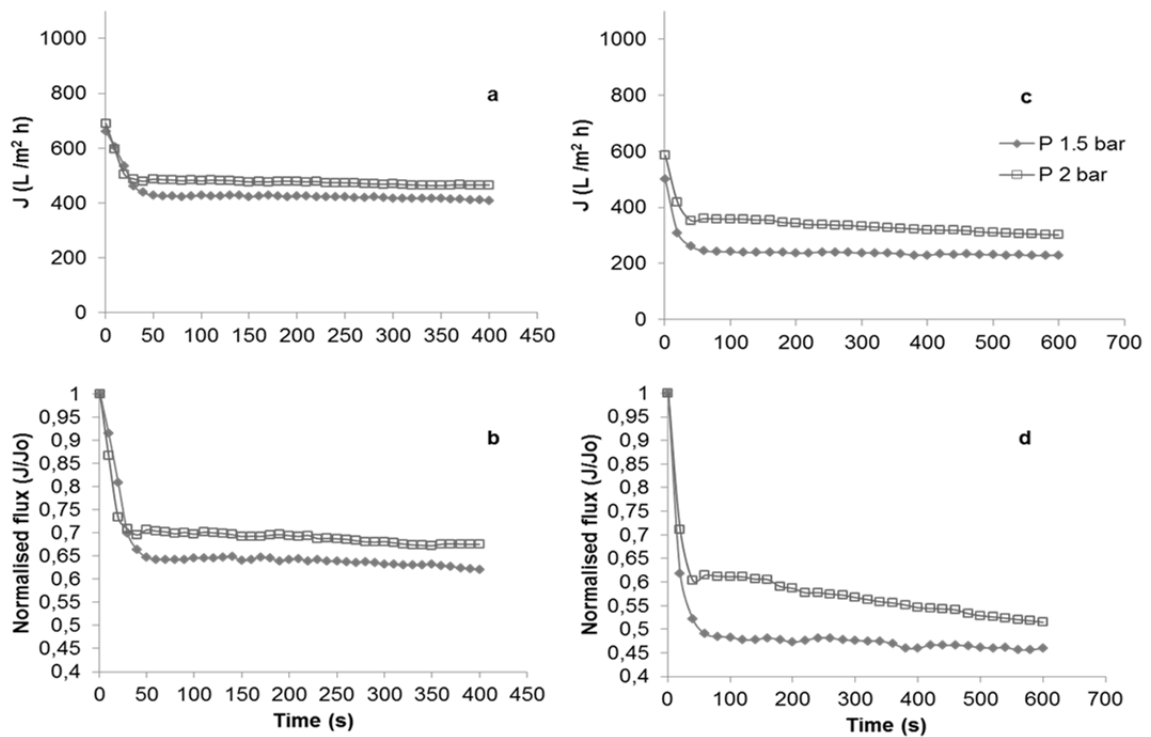
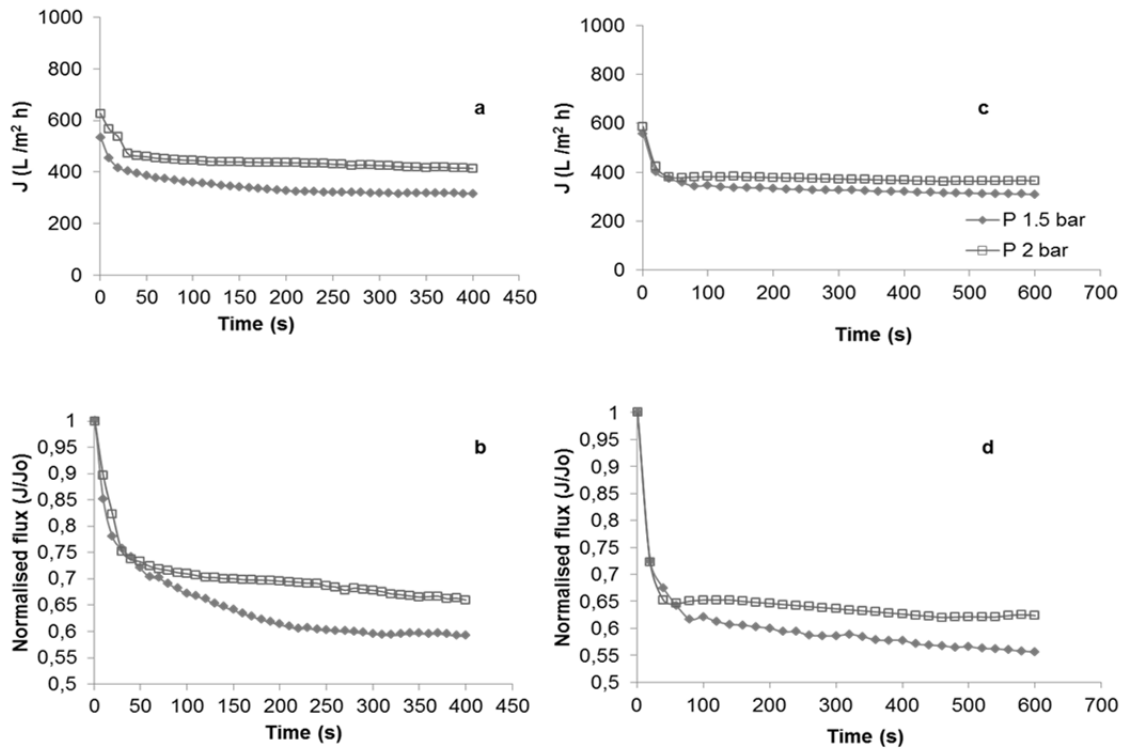


Figure 5.11. Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 1.5 L/min. Concentration HA 10 mg/L; NaCl 25 g/L; HM 10 mg/L (a, b) and HA 30 mg/L; NaCl 25 g/L; HM 10 mg/L (c, d).

The higher Robs obtained may be explained by the presence of divalent ions from the heavy metals solution added favouring HA aggregation and coagulation (Hilal et al., 2008). This was similar to the effect of monovalent ions, although the divalent ion effect on the compression of the diffuse layer is more pronounced than that of monovalent ions (Hilal et al., 2008).



**Figure 5.12.** Influence of pressure on permeate flux and normalised flux at FR 2 L/min. Concentration HA 10 mg/L; NaCl 25 g/L; HM 10 mg/L (a, b) and HA 30 mg /L; NaCl 25 g/L; HM 10 mg/L (c, d).

### 5.4. CONCLUSIONS

The performance of a ceramic microfiltration membrane was investigated under different operating conditions for the treatment of HAs solutions. The presence of HAs played an important role during microfiltration with tubular membranes. Deposition of HA particles took place and presented a significant effect over the fouling behavior of the membrane unit. As HA concentration was increased, an increase in HA retention was observed along with a decrease in permeate flux. In addition, HA retention increased considerably when additional salinity and heavy metals were added to the test

solutions. Application of higher TMP favoured smaller HA retentions, while higher FR resulted in higher HA retentions.

## 5.5. REFERENCES

- Belkacem, M., Bekhti, S., Bensadok, K., 2007. Groundwater treatment by reverse osmosis. *Desalination*. 206, 100-106.
- Blankert, B., Betlem, B. H. L., Roffel, B., 2006. Dynamic optimization of a dead-end filtration trajectory: Blocking filtration laws. *J. Membr. Sci.* 285, 90-95.
- Carroll, T., King, S., Gray, S. R., Bolto, B. A., Booker, N.A., 2000. The fouling of microfiltration membranes by NOM after coagulation treatment. *Water Res.* 34, 2861-2868.
- de Moraes Coutinho, C., Chiu, M.C., Basso, R.C., Ribeiro, A.P.B, Gonçalves, L.A.G., Viotto L.A., 2009. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review. *Food Res Int.* 42, 536-550.
- Ebrahim, S., Bou-Hamed, S., Abdel-Jawad, M., Burney N., 1997. Microfiltration system as a pretreatment for RO units: Technical and economic assessment. *Desalination*. 109, 165-175.
- Hilal, N., Al-Abri, M., Moran, A., Al-Hinai, H., 2008. Effects of heavy metals and polyelectrolytes in humic substance coagulation under saline conditions. *Desalination*. 220, 85-95.
- Katsoufidou, K., Yiantisios, S. G., Karabelas, A. J., 2005. A study of ultrafiltration membrane fouling by humic acids and flux recovery by backwashing: Experiments and modeling. *J. Membr. Sci.* 266, 40-50.
- Kulovaara, M., Metsämuuronen, S., Nyström, M., 1999. Effects of aquatic humic substances on a hydrophobic ultrafiltration membrane. *Chemosphere*. 38, 3485-3496.

- Lim, A. L. and Bai, R., 2003. Membrane fouling and cleaning in microfiltration of activated sludge wastewater. *J. Membr. Sci.* 216, 279-290.
- Ogunbiyi, O. O., Miles, N. J., Hilal, N., 2008. The effects of performance and cleaning cycles of new tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a model yeast suspension. *Desalination.* 220, 273-289.
- Prádanos, P., Arribas, J. I., Hernández, A., 1995. Mass transfer coefficient and retention of PEGs in low pressure cross-flow ultrafiltration through asymmetric membranes. *J. Membr. Sci.* 99, 1-20.
- Radjenovic, J., Matosic, M., Mijatovic, I., Petrovic, M., Barcelo, D., 2008. Membrane Bioreactor (MBR) as an Advanced Wastewater Treatment Technology. *Hdb Env Chem.* 5, 37-101.
- Soni, V., Abildskov, J., Jonsson, G., Gani, R., 2009. A general model for membrane-based separation processes. *Comput. Chem. Eng.* 33, 644-659.
- Sutzkover-Gutman, I., Hasson, D., Semiat, R., 2010. Humic substances fouling in ultrafiltration processes. *Desalination.* 261, 218-231.
- Tang, C. Y., Kwon, Y., Leckie, J.O., 2007. Fouling of reverse osmosis and nanofiltration membranes by humic acid--Effects of solution composition and hydrodynamic conditions. *J. Membr. Sci.* 290, 86-94.
- Ulbricht, M., 2006. Advanced functional polymer membranes. *Polymer.* 47, 2217-2262.
- Wang, J., Guan, J., Santiwong, S. R., Waite T. D., 2010. Effect of aggregate characteristics under different coagulation mechanisms on microfiltration membrane fouling. *Desalination.* 258, 19-27.
- Xu, J., Chang, C., Gao, C., 2010. Performance of a ceramic ultrafiltration membrane system in pretreatment to seawater desalination. *Sep. Purif. Technol.* 75, 165-173.
- Yuan, W. and Zydney A. L., 1999. Humic acid fouling during microfiltration. *J. Membr. Sci.* 157, 1-12.

## Capítulo 6

# *Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: effect of organic loading rate*

Journal of Environmental Science and Health, PartA: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 49:2, (2014), 210-217.

Camino Fernández, Begoña Carracedo, Elia Judith Martínez, Xiomar Gómez and Antonio Morán



**Abstract**

The production of H<sub>2</sub> was studied using a packed bed reactor with polyurethane foam acting as support material. Experiments were performed using mixed microflora under non sterile conditions. The system was initially operated with synthetic wastewater as the sole substrate. Subsequently, cheese whey permeate was added to the system at varying organic loading rates (OLR). The performance of the reactor was evaluated by applying a continuous decrease in OLR. As a result, a significant decrease in H<sub>2</sub> yields (HY) was observed with the decrease in OLR from 18.8 to 6.3 g COD/L d. Microbial analysis demonstrated that the presence of non-hydrogen producers, *Sporolactobacillus sp.* and *Prevotella*, was associated with low HYs obtained. This behavior indicates that the fermentation under non-sterile conditions was favored by high concentrations of substrate by creating an adverse environment to non-hydrogen producer organisms.

## 6.1. INTRODUCTION

Nowadays, the limited availability of fossil fuels and pollution associated to their use is raising environmental concern in society. According to this, research into alternative energy sources has received growing attention.<sup>[1]</sup> Hydrogen (H<sub>2</sub>) production is attractive in light of zero CO<sub>2</sub> emissions attained upon burning. Moreover, it has a high energy yield (141.8 kJ/g) which is almost 3 times that of gasoline,<sup>[2]</sup> therefore, making it an ideal alternative to fossil fuels. H<sub>2</sub> can be considered as a useful energy vector if it is regarded as a form of stored energy. In this sense, the production of H<sub>2</sub> appears as an essential support for other renewable energy sources, especially for those with an intermittent supply.<sup>[3]</sup>

Biological processes for the production of H<sub>2</sub> are gaining importance as a source of renewable fuels. These processes are considered to be more environmentally friendly and less energy intensive as compared to thermochemical and electrochemical processes.<sup>[4]</sup> Amongst them, dark fermentative H<sub>2</sub> production (FHP) is a promising method for producing biohydrogen due to its high rate of H<sub>2</sub> evolution and lack of need of light sources<sup>[5]</sup> which greatly facilitates reactor design. Nevertheless, the process is characterized by presenting an effluent stream with high organic content which should be further treated in a complementary stage.<sup>[6]</sup> In this sense, to consider this process as an alternative choice for waste treatment, the complete degradation and stabilization of organic matter should be attained.

Cheese whey is the liquid remaining following the precipitation and removal of milk casein during cheese-making. Due to its high biochemical and chemical oxygen demand (BOD and COD) content, this stream requires further treatment and disposal. In this instance, cheese whey may be valorized by means of a FHP process. Several studies have been previously conducted to evaluate process performance when using this waste stream as substrate.<sup>[7-10]</sup> However, limitations of the process should be carefully studied in order to attain economic feasibility.

The configuration of the reactor and operating conditions play an important role in the final productivity obtained. Most studies on biological FHP have been conducted in conventional continuously stirred tank reactor (CSTR). However, immobilized-cell



reactors seem to be more advantageous than CSTR in terms of high H<sub>2</sub> productivities. [11]

The feasibility of anaerobic batch reactor containing immobilized biomass on polyurethane foam (PUF) has been shown to be suitable for the treatment of low-strength synthetic wastewater by Ratusznei et al. [12]. Yang et al. [13] studied different bed materials. Amongst them, results on PUF as support material demonstrated a better performance. Similar results were reported by Jo et al., [14] who reported an improvement in the efficiency of substrate utilization and H<sub>2</sub> productivity when using immobilized *Clostridium tyrobutyricum* JMI in a packed bed reactor with PUF.

In the present research, it was studied the FHP process using synthetic wastewater (SW) and cheese whey permeate (CWP) as substrates in a packed bed anaerobic reactor with PUF as support material and the use of mixed microflora. Changes in organic loading rate (OLR) were performed with the aim of evaluating the effect over H<sub>2</sub> producing activity.

## **6.2. MATERIALS AND METHODS**

### **6.2.1. Substrates and inoculum**

SW was prepared using sucrose (20 g COD/L) supplemented with the following nutrients (adapted from [15]): 21 mg/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 mg/L NaCl, 7 mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 4.8 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 50 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 30 mg/L of yeast extract.

CWP was obtained from a cheese factory at Zamora (Spain). This substrate was used in experiments for evaluating the performance of the packed bed reactor. The chemical characteristics of CWP are presented in Table 6.1.

The H<sub>2</sub> producing microflora was generated from biosolid pellets obtained from the wastewater treatment plant of the city of León (Spain). Description of this plant is presented elsewhere. [16] The solid content of these pellets was 93.6% of total solids (TS) and 61.6% of volatile solids (VS). In order to foster the adaptation of active H<sub>2</sub> producing bacteria, 10 g of pellets, 30 g of sucrose and tap water were added to an Erlenmeyer flask until the working volume reached 500 mL. Batch fermentation was

conducted in the Erlenmeyers at a controlled mesophilic temperature ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 32 h. The Erlenmeyers were provided with magnetic stirrers. Samples were collected for microbial analysis at 24 and 32 h after the start-up of these systems. Subsequently, the culture was used as inoculum.

**Table 6.1.** Chemical characteristics of CWP.

Parameters	Units	CWP
TS	(g/L)	$48.61 \pm 0.02$
VS	(g/L)	$44.60 \pm 0.04$
COD	(g/L)	$60.4 \pm 1.6$
pH	-	5.3
Alkalinity	(g/L)	0.92
KN	(g/L)	0.88
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	(mg/L)	0.075
Na <sup>+</sup>	(mg/L)	291
Ca <sup>+</sup>	(mg/L)	258
K <sup>+</sup>	(mg/L)	1034
Cl <sup>-</sup>	(mg/L)	1058
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	(mg/L)	<40
SO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	(mg/L)	104
NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	(mg/L)	<20
Lactose	(g/L)	$43.79 \pm 0.09$
Lactic acid	(g/L)	$1.44 \pm 0.01$

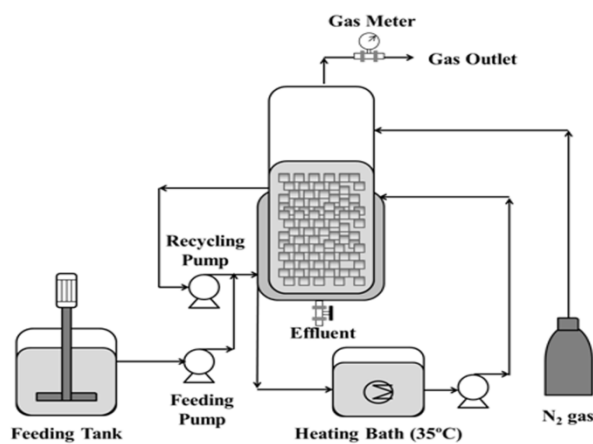
### 6.2.2. Erlenmeyers tests

Two Erlenmeyers flasks with a volume of 500 mL (working volume of 250 mL) were used as reactors. These Erlenmeyers were filled with polyurethane foam (PUF) cubes with an average size of 3 cm side and porosity of  $0.9 \text{ m}^3/\text{m}^3$ . Inoculum was added until the working volume reached 250 mL. Reactors were operated under mesophilic regimen ( $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ ) in a semi-continuous mode during 50 d. Fermentation systems operated during the first 10 d at an HRT of 12.5 d (OLR of 1.6 g COD/L d). The HRT

was subsequently reduced till reach a value of 2 d (OLR of 10.0 g COD/L d). pH was corrected to 5.5 after feeding the reactor. Samples were collected from these reactors at the end of these experiments for microbial analysis.

### 6.2.3. Tubular packed bed reactor

Figure 6.1 shows a schematic description of the reactor used in this study. This reactor was operated using SW as substrate in a first experimental stage and CWP in a second experimental period. The reactor was a column with a diameter of 92 mm, a height of 1700 mm and 4 L of working volume (liquid volume). The packed bed reactor was maintained at mesophilic temperature ( $35 \pm 1$  °C) by a water jacket. The feed was stored at 4 °C in a feeding tank provided with a mechanical stirrer. The reactor was run on a semi-continuous mode of operation. The feeding procedure was performed once daily by means of a peristaltic pump. In order to keep anaerobic conditions, the head of the reactor was purged with nitrogen gas during each withdrawing stage. Agitation was conducted by periodical recirculation of the liquid content of the reactor by using a peristaltic pump. The pH of the liquid inside the reactor was controlled in the range 4.5 - 5.5 in order to avoid the growth of methanogens. <sup>[17]</sup>



**Figure 6.1.** Schematic description of the packed bed reactor for  $H_2$  production.

The column was packed with PUF cubes as support material. This reactor was inoculated with the liquor and PUF cubes obtained from the Erlenmeyers flasks tests (previously described). Additional PUF cubes were necessary to complete the working

volume of the reactor and 0.5 L of inoculum prepared from biosolid pellets were also introduced. Finally, 3 L of SW were added as substrate.

The system worked in batch mode for 2 d and thereafter operated on a semi-continuous mode using SW as substrate. The reactor was initially operated with an HRT of 4 d (OLR 5 g COD/L d) being gradually reduced until reach a value of 1 d. Variations in operating conditions were performed due to the worsening of performance of the reactor on day 17<sup>th</sup> of operation. Reinoculation was necessary on day 23<sup>rd</sup>. In this case, a volume of 2 L was removed from the packed bed reactor and was substituted by 1 L of inoculum and 1 L of feeding solution (SW). The production of H<sub>2</sub> was recovered after 24 h and normal operation was resumed. Afterwards, the process was evaluated during 14 d at an HRT of 2 d.

In the next experimental phase, the feeding stream of the packed bed reactor was substituted by CWP. The reactor was operated in 4 periods. The HRT was set at 2 d and OLR was reduced (from 18.8 to 6.3 g COD/L d) by dilution of CWP with tap water to the desired COD concentration. Finally, the HRT was reduced to 1 d (OLR of 12.5 g COD/L d). A description of operating conditions of the packed bed reactor is shown in Table 2. The study of reactor performance when using CWP as substrate was divided in four periods (PI – PIV) as shown in this table. During period IV, alkaline solution was added to the feeding to adjust its pH to 7.5. Samples for microbial analysis were collected at the end of periods I and III.

**Table 6.2.** Operating conditions of packed bed reactor using SW and CWP as substrate.

Substrate	HRT (d)	OLR (g COD/L d)		
SW	2	10		
CWP	2	18.8 (PI)	12.5 (PII)	6.3 (PIII)
CWP	1	12.5 (PIV)		

Biogas flow was measured using a water displacement device. Gas production results were normalized to a standard temperature (0 °C) and pressure (760 mmHg). Furthermore, gas and liquid samples were collected for monitoring gas composition, TS, VS, COD, volatile fatty acids (VFA), ethanol, and lactic acid content.

#### 6.2.4. Analytical techniques

Kjeldahl nitrogen (KN), TS, VS, COD, alkalinity, ammonium and pH were determined in accordance with Standard Methods. <sup>[18]</sup> Chloride, phosphate, nitrate and sulphate were measured using capillary electrophoresis. (Agilent G1600). Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-AES) (Perkin Elmer Optima 2000 DV) was used for determining calcium, potassium and sodium concentration.

Biogas composition was analyzed using a gas chromatograph (Varian CP 3800 GC) <sup>[6]</sup>. Lactic acid content and lactose were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a refractive index detector (RID) and a PL Hi-Plex H 8µm column from Varian. Sulphuric acid of 0.005 M was used as a mobile phase with a flow rate of 0.4 mL/min. Ethanol content was analyzed with a gas chromatograph (Varian CP 3800 GC) equipped with a fused silica capillary coated column Cp-Wax 57 CB (50 x 0.25mm x 0.2 µm) from Varian. The carrier gas was helium. The temperature of the injector and detector were both 250 °C, and the temperature of the oven was initially set at 60 °C for 2 min and thereafter increased to 180 °C. Data obtained from reactor performance were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) using Origin 6.1 software.

#### 6.2.5. Microbial community analysis

DNAs from the cultures were extracted by using the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratory Inc., USA). For DNA extraction and purification in this study, the 16S rDNA fragments were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). The region corresponding to positions 357 and 518 in the 16S rDNA of *Escherichia coli* was PCR-amplified using the forward primer EUB357f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') with a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC-3') at the 5' end to stabilize the melting behavior of the DNA fragments and the reverse primer UNIV518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). PCR amplification was conducted in an automated thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem, USA). PCR products were electrophoresed on 1% (wt/vol) agarose gel in

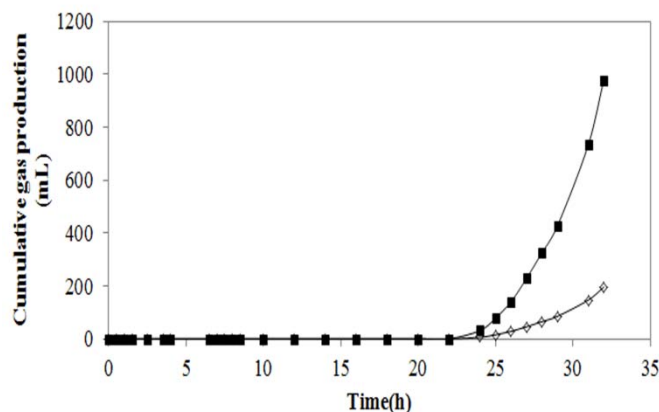
1 × TAE for 30 min for 80 V, and then checked with GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc, USA) to confirm the amplification.

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) was carried out using the Dcode™ Universal Mutation Detection System (BioRad, California, USA). PCR products were electrophoresed in 1 × TAE buffer for 480 min at 70 V and 60 °C on polyacrylamide gel (7.5%) containing a linear gradient ranging from 40 to 60% denaturant. After electrophoresis, polyacrylamide gel was stained with GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain for 30 min, and then visualized on UV transilluminator. Most of the bands were excised from DGGE polyacrylamide gel for 16S rDNA sequencing. DNA fragments from the bands excised were PCR-amplified with the forward primer EUB357f without a GC clamp and the reverse primer UNIV518r. After PCR amplification, PCR products were purified using a Kit Nucleic Acid and Protein Purification Macherey-Nagel (Clontech, USA). All the strands of the purified PCR products were sequenced with primers EUB357f by ABI PRISM Big Terminator Cycle Sequencing Kit and Amersham MegaBace DNA sequencer (GE Healthcare, USA). Sequence data were analyzed with Chromas Lite 2.01 software (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA, USA) and submitted to the non-redundant nucleotide database at GenBank using the BLAST program through the website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

## **6.3. RESULTS AND DISCUSSION**

### ***6.3.1 Batch fermentation***

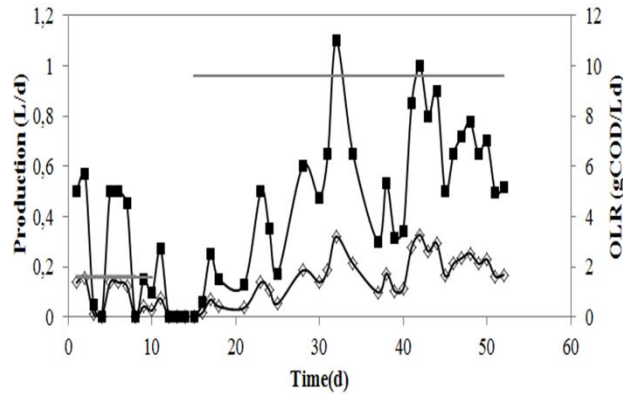
Biogas produced after 32 h reached a maximum value of 978 mL (See Fig. 6.2). The VFA analysis showed a content of 343 and 1776 mg COD/L of acetic acid and butyric acid respectively. The results from DGGE analysis revealed that the genus *Clostridium* was dominant in the culture, specifically the species *Clostridium acetobutyricum* (at 24 h of culture) and *Clostridium butyricum* (at 32 h of culture). These *Clostridium* species are H<sub>2</sub> producers reported in several studies.<sup>[19,20]</sup>



**Figure 6.2.** Evolution of biogas and H<sub>2</sub> production during batch fermentation for activating H<sub>2</sub> producing microorganisms. H<sub>2</sub> production (◊), Biogas production (■).

### 6.3.2 Erlenmeyers tests

Figure 6.3, shows the profiles of the averaged production of biogas and H<sub>2</sub> obtained. Intermittent gas production was initially observed. This behavior was probably due to the high content of organic compounds in the inoculum. Feeding was stopped on day 8<sup>th</sup>, and during 5 days, the pH of the systems was controlled in the range of 4.5 – 5.5 units. Afterwards, feeding was resumed at an OLR of 10.0 g COD/L d. The performance of the system remained unsteady with a fluctuating production of biogas as it may be observed from Figure 6.3. H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were the main gaseous products. The highest H<sub>2</sub> yield (HY) attained was 135.9 L H<sub>2</sub>/kg COD. Instability might be explained by the absence of stirring in the system that favored the accumulation of dissolved H<sub>2</sub>. High partial pressures were likely to occur (not measured), due to the high biogas accumulation observed in the headspace of the Erlenmeyers. The high H<sub>2</sub> partial pressure (pH<sub>2</sub>) is one of the reasons that lows HMY. For ferredoxin, hydrogen production can continue as long as the hydrogen partial pressure is less than 3x10<sup>4</sup> Pa; for NADH, the partial pressure of hydrogen must be less than 6x10<sup>-4</sup> atm. <sup>[21]</sup> It has been reported that stirring clearly aids to improve H<sub>2</sub> in comparison with static fermentation experiments. <sup>[22]</sup> Although microflora was submitted to an adverse environment, H<sub>2</sub> production was maintained for over a period of 30 d.



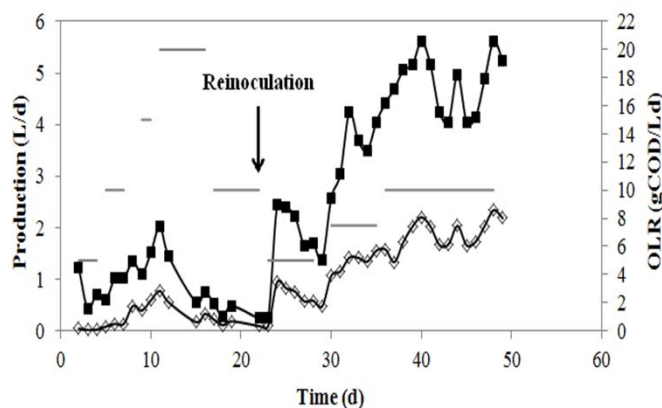
**Figure 6.3.** Evolution of biogas production, H<sub>2</sub> production and OLR applied during erlenmeyer flask tests. H<sub>2</sub> production (◊), Biogas production (■), OLR (—).

Signals of biomass accumulation could be visible on the surface of the support material. However, microbial analysis at the end of this experiment revealed the dominance of *Sporolactobacillus sp.* These microorganisms have been reported to decrease hydrogen yield due to inhibitory effects caused by the excreted bacteriocins. [23]

### 6.3.3 Tubular packed bed reactor: Synthetic wastewater

H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were the main gaseous products obtained and methane was always under the detection limit. The reactor was characterized by an initial low production of biogas as consequence of the characteristics of the inoculum used (See Fig. 6.4). The strategy of modifying operating conditions by a decrease in HRT from 4 to 1 d in a period of 10 d did not result in a better performance. The maximum value of biogas production was 2.02 L/d with H<sub>2</sub> content of 35.1%, which was obtained on day 11<sup>th</sup> of operation. An increase in OLR to 20 g COD/L d resulted in a severe reduction in H<sub>2</sub> production.



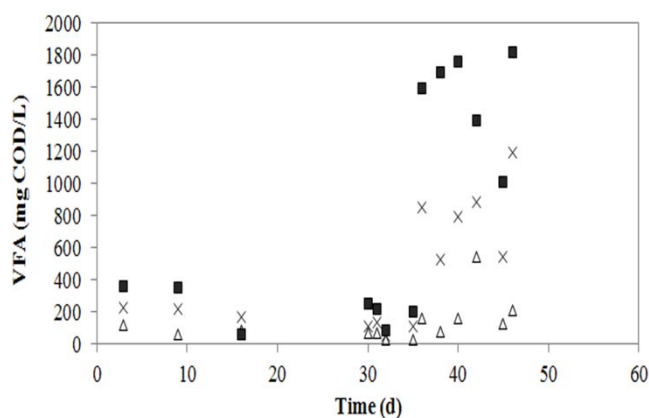


**Figure 6.4.** Biogas production, H<sub>2</sub> production and OLR applied during fermentation experiments in a packed bed reactor employing SW as substrate. H<sub>2</sub> production (—◇—), Biogas production (—■—), OLR (—).

Total VFA concentrations were initially low (see Fig. 6.5) and the pattern of acid production followed a decreasing trend (values in the range 622.0 - 312.9 mg COD/L) with acetate being the main component. Moreover, after reaching an HRT of 1 d, the production of H<sub>2</sub> decreased immediately. This result may be a consequence of the operating conditions applied to the system. Biomass was not properly fixed and was washed out from the reactor.

Reinoculation was performed on day 23<sup>rd</sup>. The inoculum used was prepared from biosolid pellets as previously described in materials and methods section. The reactor was operated at higher HRTs. As it can be seen from Figure 6.4, the performance of the reactor rapidly improved and biogas production was recovered. From the 36<sup>th</sup> day onwards, the system was evaluated at an HRT of 2 days (OLR 10 g COD/L d). Although at these conditions the HY was increased to a value of 48.4 L H<sub>2</sub>/kg COD, this value was lower compared to the maximum value observed in the previous immobilized systems and those reported in literature for FHP. Keskin et al. [24] employed an immobilized reactor packed with ceramic balls. These authors achieved an HY of 189 mL H<sub>2</sub>/g sucrose using as substrate a solution of 10 g sucrose/L and an HRT of 24 h. While, Chang et al. [25] obtained an HY of 42 - 130 mL H<sub>2</sub> /g COD using as substrate a solution of sucrose (20 g COD/L) in a fixed-bed reactor packed with expanded clay and activated carbon.

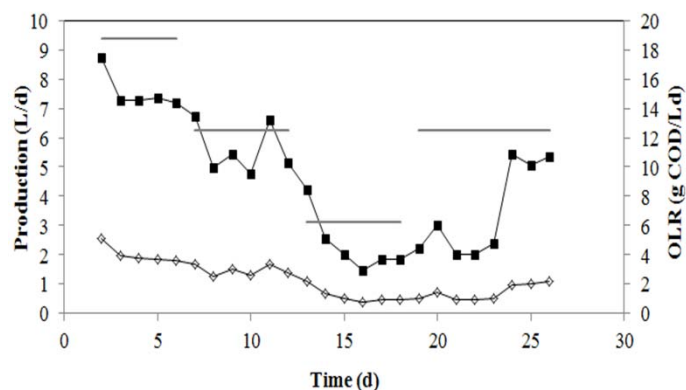
From Figure 6.5, it can be observed that H<sub>2</sub> production was accompanied by an increase in acid concentration. The main intermediaries were acetic and butyric acids. Propionic acid was also present although in much lower concentration. Several authors have proposed the ratio of butyric to acetic acid (Bu/Ac) as an indicator of substrate metabolism and predictor of HY. [26, 27] During these experiments (Bu/Ac) ratio was in the range 0.7 – 0.9. Previously, during batch fermentation with sucrose, the presence of *Clostridium butyricum* was detected combined with a Bu/Ac ratio of 2.0. The reduction of Bu/Ac ratio might be associated to the presence of other fermenters in the reactor that lead to shifts in metabolic pathways decreasing the volume of H<sub>2</sub> produced.



**Figure 6.5.** Concentration of VFAs during fermentation experiments in a packed bed reactor employing SW as substrate. Acetic acid (x), Propionic acid (Δ), Butyric acid (■).

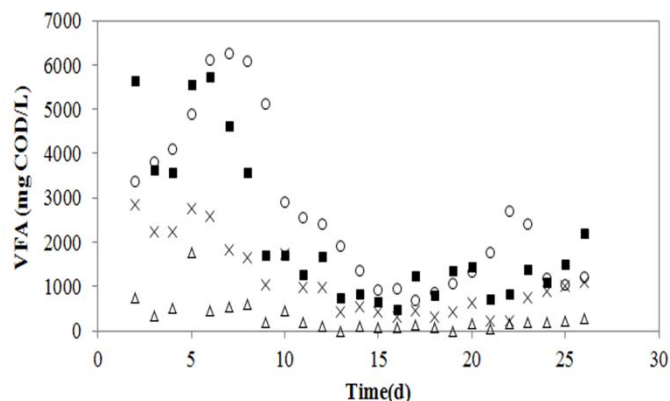
#### 6.3.4 Tubular packed bed reactor: Cheese whey permeate

Biogas and H<sub>2</sub> production are presented in Figure 6.6. Parameters for evaluating the performance of the reactor are summarized in Table 6.3. H<sub>2</sub> content in the gas phase was between 20 and 27%. CO<sub>2</sub> was detected as the second main gaseous product whereas no CH<sub>4</sub> was observed, indicating the lack of methanogens. The reduction applied in OLR resulted in a decrease in daily production of H<sub>2</sub>. However, HY was not affected when OLR was reduced from 18.8 to 12.5 g COD/L d.



**Figure 6.6.** Biogas production, H<sub>2</sub> production and OLR applied during fermentation experiments in a packed bed reactor employing CWP as substrate. H<sub>2</sub> production (◇), Biogas production (■), OLR (-).

The predominant metabolites were butyric and acetic acids (Fig. 6.7). In general, production of acetic and butyric acids favors production of H<sub>2</sub>, although the acetic acid production may also be related to the consumption of H<sub>2</sub>, which consequently leads to lower H<sub>2</sub> yields. [28] Furthermore, small proportions of solvents were found in the reactor during the experiment. Ethanol concentrations attained values in a range from 48 to 1168 mg COD/L and 1181 to 1611 mg COD/L during the first and second period of operation respectively. Afterwards, ethanol was no longer detected. Solvent fermentation is associated with the early steps of sporulation of *Clostridium*. In response to hostile conditions, such as oxygen, heat, acids, or bases, the physiology of *Clostridium* may change from vegetative cells to endospores. [29] According to this, it might be assumed that the reduction of OLR favored an environment for *Clostridium* population to exist as vegetative cells, therefore decreasing the solvent production. It was also observed that at the lowest OLR tested, the HY obtained was reduced. This reduction was followed by a decrease in the content of VFAs. The decrease in OLR also caused a decrease in the content of lactic acid (see Fig. 6.7).



**Figure 6.7.** Concentration of VFAs during fermentation experiments employing CWP as substrate. Acetic acid (x), Propionic acid ( $\Delta$ ), Butyric acid ( $\blacksquare$ ), Lactic acid ( $\circ$ ).

These results are in agreement with those reported by Kim et al. [30] These authors reported a dependence of H<sub>2</sub> production on substrate concentration, with a lower HY being reported with the decrease in substrate concentration. The metabolic products as well as the volume of H<sub>2</sub> gas produced depends on the dominant microbial species contained in the reactor and on the metabolic pathway they followed under the prevailing conditions. The presence of other co-existing microorganisms might hinder H<sub>2</sub> production by acting as H<sub>2</sub> consumers or substrate competitors. [31]

**Table 6.3.** Performance of the packed bed reactor during experiments feeding with CWP as substrate.

Period	I	II	III	IV
<b>HRT(d)</b>	2	2	2	1
<b>OLR(g COD/L d)</b>	18.8	12.5	6.3	12.5
<b>H<sub>2</sub> content (%)</b>	25.7±0.8	26.3±1.0	25.7±1.2	19.4±1.4
<b>HY(L H<sub>2</sub>/kg COD<sub>feed</sub>)</b>	24.8±3.8	25.0±3.1	18.1±3.2	18.2±1.0
<b>HY(mol H<sub>2</sub>/mol lactose)</b>	0.459±0.070	0.463±0.057	0.335±0.059	0.337±0.024

Samples taken from the reactor at the end of periods I and III were analyzed by DGGE. The presence of *Sporolactobacillus sp.* and microorganisms of the genus *Prevotella* were detected in the culture obtained from both samples. Members of the genera *Prevotella* were found in other H<sub>2</sub> producing reactors, [8, 10] though these organisms have been reported in literature with no fermentative capacity for producing

H<sub>2</sub>. In addition, the presence of *Sporolactobacillus sp.* was also found during the fermentation of sucrose in the previous assay carried out in Erlenmeyers Flasks. Despite the fact that H<sub>2</sub> production did not cease during the experiment, H<sub>2</sub> producers were not identified in any of the two samples taken. This is explained by the size of their population which was below the limit of detection by DGGE technique. During the operation of the reactor, an enrichment of non-hydrogen producers took place that competed for substrate up-take and negatively affected the prevalence of H<sub>2</sub> producers. The persistence of a mixed microbial population with a low proportion of hydrogen-producing bacteria could explain the lower yield (Table 6.3) obtained compared with the maximum theoretical expected value (8 mol H<sub>2</sub>/ mol lactose).

Similar results were reported by Perna et al. [32] These authors performed experiments in an upflow anaerobic packed bed reactor treating cheese whey. They obtained a maximum H<sub>2</sub> yield of 1.1 mol H<sub>2</sub>/mol lactose. However, from the microbial analysis they also detected a mixed population with non-hydrogen-producing organisms and a low proportion of H<sub>2</sub> producing fermenters. On the other hand, Davila-Vazquez et al., [33] when studying the fermentative production of H<sub>2</sub> with cheese whey as substrate, reported the presence of *Clostridium sp.* as the main organism and the HYs attained were in the range of 2.1 - 2.8 mol H<sub>2</sub>/mol lactose. Thus, to improve the performance, it will be necessary to regularly modify operational conditions to reduce the dominance of non-hydrogen producing microorganisms. Among these alternatives, repeated heat shock has been claimed as one of the most effective ways to avoid competition and maintain a successful operation. [34] However, an evaluation of the cost of energy involved under continuous operation should be performed prior to considerer this alternative as a viable option.

Finally, the effect of increasing the OLR (by a reduction in HRT) over H<sub>2</sub> production was investigated. In this case, the concentration of COD in the influent was kept constant (12.5 g COD/L) but HRT was reduced to 1 day. During 3 days under these conditions, it was not observed an increase in H<sub>2</sub> production, while lactic acid concentration increased to reach a maximum value of 2688 mg COD/L.

Zhu et al., [35] in batch experiments, showed that H<sub>2</sub> production of feedstocks with limited alkalinity improved significantly with buffer addition if the initial pH was

greater than 6.0. A higher initial pH could be sufficient to rapidly buffer acid production accompanied with hydrogen production, thus the hydrogen producer may have not been inhibited. Based on this, it was decided to add alkaline solution to the feeding solution to maintain an initial pH of 7.5 units. This stage was associated with an increase in the H<sub>2</sub> production rate and VFA concentration, while lactic acid decreased indicating a possible shift of the metabolic pathway. HY was able to recover to the value obtained previously at an HRT of 2 days.

## **6.4. CONCLUSIONS**

The production of H<sub>2</sub> from SW and CWP was studied using a packed bed reactor with PUF as support material. Under semi-continuous operation the maximum HY achieved was 48.4 L H<sub>2</sub> /kg COD when using SW as substrate at an HRT of 2 d. When using CWP, the effect of varying operating conditions was tested by reducing the OLR of the reactor. The decrease in OLR from 18.8 to 6.3 g COD/L d resulted in a significant drop in HY. The experimental results indicated the presence of non H<sub>2</sub> producers that might have competed for substrate and negatively affected the prevalence of H<sub>2</sub> producers. Despite of this, H<sub>2</sub> production was detected during the whole experiment. It was observed that the H<sub>2</sub> production was favored when the feeding was interrupted, higher OLR was applied, and the pH of the feed was set at 7.5. Moreover, operational conditions and possible pre-treatments should be further evaluated in order to enhance H<sub>2</sub> productivity.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was possible thanks to the financial support of the Spanish Ministry of Science and Innovation through project Ref. Number ENE2009-10395, for funding and for the FPI fellowship granted.

## 6.5. REFERENCES

- [1] Brey, J.J.; Brey, R.; Carazo, A.F.; Contreras, I.; Hernández-Díaz, A.G.; Gallardo, V. Designing a gradual transition to a hydrogen economy in Spain. *J. Power Sources* 2006, 159 (2), 1231-1240.
- [2] Srirangan, K.; Akawi, L.; Moo-Young, M.; Chou, C.P. Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources. *Appl. Energy* 2012, 100, 172-186.
- [3] Moreno, R.; Gómez, X. Dark Fermentative H<sub>2</sub> Production from Wastes: Effect of Operating Conditions. *Journal of Environmental Science and Engineering* 2012, 1A, 936-950.
- [4] Chu, C.; Sen, B.; Lay, C.; Lin, Y.; Lin, C. Direct fermentation of sweet potato to produce maximal hydrogen and ethanol. *Appl. Energy* 2012, 100, 10-18.
- [5] Jung, K.; Kim, D.; Kim, S.; Shin, H. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 2011, 102(18), 8612-8620.
- [6] Gómez, X.; Fernández, C.; Fierro, J.; Sánchez, M.E.; Escapa, A.; Morán, A. Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation. *Bioresour. Technol.* 2011, 102(18), 8621-8627.
- [7] Azbar, N.; Dokgöz, F.T.; Keskin, T.; Eltem, R.; Korkmaz, K.S.; Gezgin, Y.; Akbal, Z.; Öncel, S.; Dalay, M.C.; Gönen, Ç.; Tutuk, F. Comparative evaluation of biohydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. *Int. J Green Energy* 2009, 6(2), 192-200.
- [8] Castelló, E.; García y, S.; Iglesias, T.; Paolino, G.; Wenzel, J.; Borzacconi, L.; Etchebere, C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrogen Energy* 2009, 34(14), 5674-5682.
- [9] Ferchichi, M.; Crabbe, E.; Gil, G.; Hintz, W.; Almadidy, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J. Biotechnol.* 2005, 120(4), 402-409.

- [10] Yang, P.; Zhang, R.; McGarvey, J.A.; Benemann, J.R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int J Hydrogen Energy* 2007, 32(18), 4761-4771.
- [11] Argun, H.; Kargi, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *Int J Hydrogen Energy* 2011, 36(13), 7443-7459.
- [12] Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D.; Camargo, E.F.M.; Zaiat, M.; Borzani, W. Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 2000, 75(2), 127-132.
- [13] Yang, Y.; Tada, C.; Miah, M.S.; Tsukahara, K.; Yagishita, T.; Sawayama, S. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Mater. Sci. Eng.* 2004, 24(3), 413-419.
- [14] Jo, J.H.; Lee, D.S.; Park, D.; Park, J.M. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresour. Technol.* 2008, 99(14), 6666-6672.
- [15] Touzel, J.P.; Albagnac, G. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiol. Lett.* 1983, 16(2-3), 241-245.
- [16] Gómez, X.; Cuetos, M.J.; Prieto, J.I.; Morán, A. Bio-hydrogen production from waste fermentation: Mixing and static conditions. *Renewable Energy* 2009, 34(4), 970-975.
- [17] Spagni, A.; Casu, S.; Farina, R. Effect of the organic loading rate on biogas composition in continuous fermentative hydrogen production. *J. Environ. Sci. Heal. A* 2010, 45(12), 1475-1481.
- [18] APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Ed.; Washington, D.C., 1998.



- [19] Koskinen, P.E.P.; Kaksonen, A.H.; Puhakka, J.A. The relationship between instability of H<sub>2</sub> production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 97(4), 742-758.
- [20] Lay, C.; Wu, J.; Hsiao, C.; Chang, J.; Chen, C.; Lin, C. Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2010, 35(24), 13445-13451.
- [21] Angenent, L.T.; Karim, K.; Al-Dahhan, M.H.; Wrenn, B.A.; Domínguez-Espinosa, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 2004, 22(9), 477-485.
- [22] Alissara, R.; Suksaman, S.; Pawinee, C.; Tsuyoshi, I. Factors Affecting Hydrogen Production from Cassava Wastewater by a Co-Culture of Anaerobic Sludge and *Rhodospirillum rubrum*. *Pakistan J Biol Sci* 2007, 10(20), 3571-3577.
- [23] Saraphirom, P.; Reungsang, A. Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Int J Hydrogen Energy* 2011, 36(14), 8765-8773.
- [24] Keskin, T.; Giusti, L.; Azbar, N. Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture. *Int J Hydrogen Energy* 2012, 37(2), 1418-1424.
- [25] Chang, J.; Lee, K.; Lin, P. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *Int J Hydrogen Energy* 2002, 27(11-12), 1167-1174.
- [26] Lee, H.; Rittmann, B.E. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102(3), 749-758.
- [27] Lin, Y.H.; Juan, M.L.; Hsien, H.J. Effects of temperature and initial pH on biohydrogen production from food-processing wastewater using anaerobic mixed cultures. *Biodegradation* 2011, 22(3), 551-563.

- [28] Antonopoulou, G.; Gavala, H.N.; Skiadas, I.V.; Angelopoulos, K.; Lyberatos, G. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresour. Technol.* 2008, 99(1), 110-119.
- [29] Chen, W.; Sung, S.; Chen, S. Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *Int J Hydrogen Energy* 2009, 34(1), 227-234.
- [30] Kim SH; Han, S.; Shin, H. Performance comparison of a continuous-flow stirred-tank reactor and an anaerobic sequencing batch reactor for fermentative hydrogen production depending on substrate concentration. *Int J Hydrogen Energy* 2005, 32(10-11), 23-29.
- [31] Hung, C.; Chang, Y.; Chang, Y. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. *Bioresour. Technol.* 2011, 102(18), 8437-8444.
- [32] Perna, V.; Castelló, E.; Wenzel, J.; Zampol, C.; Fontes Lima, D.M.; Borzacconi, L.; Varesche, M.B.; Zaiat, M.; Etchebere, C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int J Hydrogen Energy* 2013, 38(1), 54-62.
- [33] Davila-Vazquez, G.; Cota-Navarro, C.; Rosales-Colunga, L.; de León-Rodríguez, A.; Razo-Flores, E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *Int J Hydrogen Energy* 2009, 34(10), 4296-4304.
- [34] Duangmanee, T.; Padmasiri, S.I.; Simmons, J.J.; Raskin, L.; Sung, S. Hydrogen Production by Anaerobic Microbial Communities Exposed to Repeated Heat Treatments. *Water Environ. Res.* 2007, 79(9), 975-983.
- [35] Zhu, H.; Parker, W.; Basnar, R.; Proracki, A.; Falletta, P.; Béland, M.; Seto, P. Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes. *Bioresour. Technol.* 2009, 100(21), 5097-5102.

## *Capítulo 7*

# *Thermophilic digestion of cheese whey: coupling $H_2$ and $CH_4$ production*

Submitted to Biomass & Bioenergy

Camino Fernández, Julio Fierro, Elia Judith Martínez and Xiomar  
Gómez



**Abstract**

The thermophilic digestion of cheese whey was evaluated using a single and two stage configuration (H<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub>) in a sequencing batch reactor (SBR). The single stage process presented stable performance with a specific methane production (SMP) of  $314.5 \pm 6.6$  L CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> COD<sub>feed</sub> (Chemical oxygen demand) at a hydraulic retention time (HRT) of 8.3 days. On the contrary, the two stage process presented instabilities at an HRT of 12.5 days and acidification was observed at an earlier stage. This behaviour was indicative of process inhibition by high concentrations of sodium and potassium ions as a consequence of pH control during the H<sub>2</sub> producing stage. The highest SMP attained was  $340.4 \pm 40$  L CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> COD<sub>feed</sub> at an HRT of 12.5 d for the digestion phase. The performance of the digestion process was also analysed by means of Fourier transform infrared (FTIR) and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectroscopy. The two stage process showed higher content in triacylglycerol groups probably associated with changes in archaeal lipid complexes as a microbial response to a higher salinity environment.

## **7.1. INTRODUCTION**

The treatment of effluents containing high concentrations of organic matter is usually carried out by anaerobic digestion. This process reduces chemical oxygen demand (COD) and also produces biogas consisting mainly of methane and carbon dioxide [1]. There are several features that make this technology suitable for industrial power generation. Nevertheless, improvements are still required on both environmental characteristics and economics of the overall process to make the technology acceptable broad base [2].

Cheese whey (CW) is a by-product from cheese factories that represents between 85 and 90% of the total volume of processed milk. Lactose is the main component (4.5–5%), but other substances are also present: proteins (0.6–0.8%), lipids (0.4–0.5%) and salts (0.7%) [3]. Because of its high organic content, anaerobic digestion is one of the preferred methods for treating this effluent. Although CW may find application in food industry and also serve as animal feeding, in some localised areas, it can become a matter of concern due to the risk of environmental contamination if it is improperly disposed [4]. Other alternatives are the aerobic treatment by conventional activated sludge processes but these are rather expensive [5]. Moreover, anaerobic digestion is economically more attractive because of the lower energy requirements, the generation of methane and lower amount of sludge produced.

The anaerobic digestion of CW has been widely studied using single and two-stage systems [6–8]. The use of a two stage process enables independent optimisation of operating conditions for acidogenesis and methanogenesis phases. Higher organic loads can be applied, since inhibitions due to acid intermediaries are attenuated. Furthermore, the two-stage process may increase energy recovery by the production of hydrogen (H<sub>2</sub>) gas in the first fermenting phase [9, 10]. Several studies have been previously conducted to evaluate H<sub>2</sub> production when using CW as substrate [11–13]. However, this process has some disadvantages such as the need for controlling pH. Optimum pH values are in the range of 4.5–6.5 units [14] with regulation being usually carried out by the addition of chemical reagents like sodium and calcium hydroxides [15]. Thereby, the effect of high concentrations of these ions over a second digestion phase is a matter of concern.

With regard to the temperature of the process, the thermophilic digestion provides several advantages compared to its mesophilic counterpart such as faster metabolic rates, higher methane yields and higher pathogen reductions [16]. However, thermophilic systems also present several drawbacks, such as greater sensitivity to operating conditions and additional energy requirements to maintain higher temperatures [17, 18]. In addition, the characteristics of organic matter and the type of volatile compounds released are greatly affected by the temperature of the process.

Fourier transform infrared (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies are frequently used to study the course of digestion [19–21]. The main advantage of these types of analyses is that all compounds present in the sample are simultaneously measured, thereby simplifying and speeding up the analysis [22]. In particular, <sup>1</sup>H NMR has been selected as a useful tool thanks to its ability to selectively identify different types of C and H moieties, while allowing the comparison between main functional groups [23].

The aim of this work was to study the thermophilic digestion of CW under a single and two-stage configuration for H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production. FTIR and H<sup>1</sup>NMR spectroscopy analysis were used as analytical tools for evaluating the effect of salinity over the second digestion phase. Comparison was performed between samples obtained at different hydraulic retention times (HRTs).

## 7.2. MATERIALS AND METHODS

### 7.2.1. *Substrates and inoculum*

CW was obtained from a cheese factory at Zamora (Spain). The CW liquid effluent was obtained after treatment with a membrane separation unit designed to recover proteins, thereby resulting in a liquid waste stream with poor nitrogen content. Anaerobic sludge was obtained from the wastewater treatment plant of the city of Leon (Spain) and was used for inoculating the thermophilic reactor. Prior to beginning any experiment, the inoculum was kept in ambient storage until the complete cessation of biogas production.

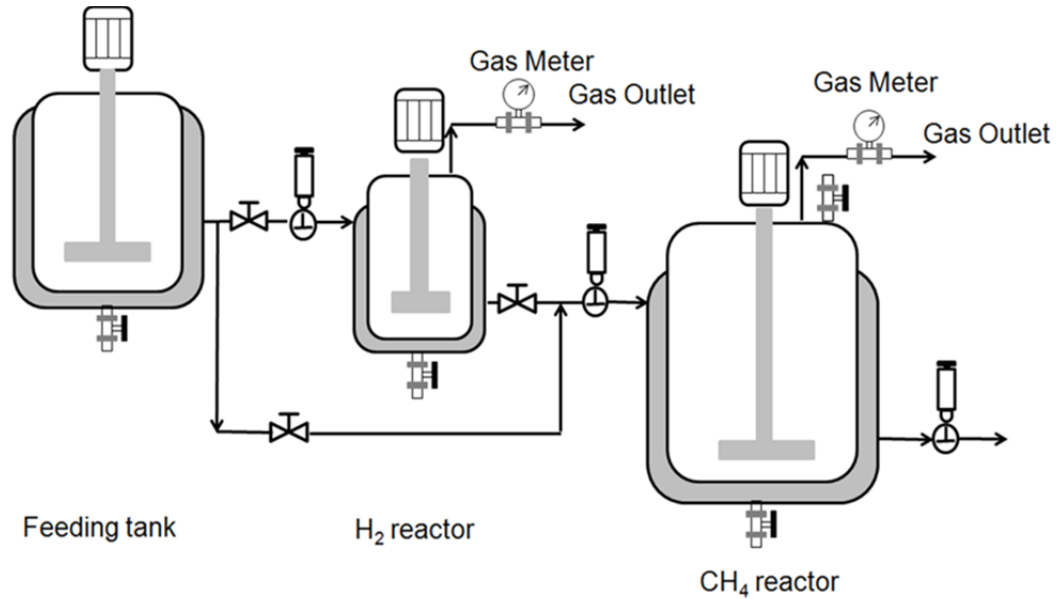
The H<sub>2</sub> reactor used indigenous microflora as inoculum in accordance with previous works reported by Antonopoulou et al. [24] and Venetsaneas et al. [25]. The reactor was loaded with CW and kept under thermostatised ( $35 \pm 1$  °C) conditions for 24 h.

### 7.2.2. Experimental setup

Experiments were carried out using an automatic plant composed of three tanks: a feeding tank and two reactors constructed in stainless steel. The plant could be configured to work as a single-stage reactor or as a two-stage system to produce H<sub>2</sub> and methane simultaneously (Figure 7.1).

The feeding tank consisted of a 20 L vessel, provided with a stirring mechanism and an external refrigeration unit (HIROSS ICE-005 STD), where the substrate was stored at  $4 \pm 1$  °C. From this tank, the substrate was intermittently distributed to the reactor by means of a pneumatic injection system. The reactor used for producing H<sub>2</sub> had a working volume of 3 L and it was thermostatised at  $35 \pm 1$  °C. The reactor used for methane production had a working volume of 25 L and operated at a temperature of  $55 \pm 1$  °C as a sequencing batch reactor (SBR) allowing periods for feeding, settling and effluent withdrawing. Reactors were cylindrical in shape with a heating jacket through which water was circulated. The temperature inside the reactors and feeding tank was measured using Pt-100 thermoresistances. The volume of biogas produced was measured using an impulse flowmeter. The control of pH in the H<sub>2</sub> producing reactor was made by adding alkaline solution. The pH was adjusted to 5.5 units during the fermentation whenever dropped to 4.5. The alkaline solution was prepared by mixing NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and KOH in a proportion of 1:1.5:1 (weight). The total solid (TS) concentration of this solution was 210 g L<sup>-1</sup>.





**Figure 7. 1.** Schematic description of the plant used for single and two stages anaerobic digestion processes.

### 7.2.3. Operating conditions

The thermophilic SBR was used for digesting CW in a single stage configuration and subsequently was used as a second stage digester for treating acid CW. This latter experiment involved a  $H_2$ -producing reactor in a first stage thus generating an acid stream which served as feed for the thermophilic SBR.

When operating as a single stage process the organic loading rate (OLR) was increased stepwise until reach a value of  $1.5 \text{ g COD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (30 days period). This adaptation period at low OLR was established to acclimatise the anaerobic microflora and avoid acidification problems. Afterwards, the reactor was operated at HRTs of 25, 16.7, 12.5 and 8.3 days (increasing the OLR from  $1.5\text{--}4.6 \text{ g COD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) with this latter being maintained for a period equivalent to 4 HRTs.

During normal operation, mixing was stopped for a period of one hour to allow the settling of biomass. The clarified effluent was withdrawn from the upper outlet of the reactor and an equivalent volume of feeding was added. Finally, mixing was restarted for the reaction phase. This cycling procedure was performed every 6 h. Urea

was added to the reactor as nitrogen supplement to account for a COD:N ratio of 35 [26, 27]. Homogenised samples were taken twice a week for analysis.

The operation under two-stage configuration involved the start-up phase of a H<sub>2</sub> producing reactor by activating indigenous microflora as described in 7.2.1 section. The start-up procedure was followed by the operation under semi-continuous mode. HRTs were evaluated at 3–1.5 days (OLR 12.7–25.3 g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) for the H<sub>2</sub>-producing stage. Urea was also added to keep the same COD:N ratio. On the other hand, the thermophilic SBR from the previous experiment was operated back to an HRT of 50 days (for an 8 days period) previous to the change of feeding to acidified CW. Afterwards, this reactor was operated as a second stage at an HRT of 25 days for the treatment of acidified CW. This digestion process was studied at varying HRT from 25 to 12.5 days (OLR 1.2–2.4 g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

Samples of gas, effluent and reactor content were collected for liquid and gas phase analysis during the experiments. Fermentation was monitored for gas composition, TS, volatile solids (VS), COD, volatile fatty acids (VFAs), alkalinity and ammonium concentration.

### ***7.2.4. Analytical techniques***

Kjeldahl nitrogen (KN), TS, VS, COD, alkalinity, ammonium, and pH were determined in accordance with American Public Health Association (APHA) standard methods [28]. Chloride, phosphate, nitrate and sulphate were measured using capillary electrophoresis (Agilent G1600). Total phosphorous (TP), calcium, potassium and sodium were determined by the use of inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-AES) (Perkin Elmer Optima 2000 DV). Lactic acid and lactose content were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) using a refractive index detector (RID) and a PL Hi-Plex H 8µm column from Varian. Sulphuric acid of 0.005 M was used as a mobile phase with a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup>.

Gas production data were normalised to standard temperature and pressure (0 °C and 1 atm). Biogas composition was analysed using a gas chromatograph

(Varian CP 3800 GC) equipped with a thermal conductivity detector. A column 4 m long, packed with HayeSepQ80/100, followed by a molecular sieve column 1 m long, was used to separate CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub>. The carrier gas was helium and the columns were operated at 331 kPa at a temperature of 50 °C.

VFAs were analysed using a gas chromatograph (Varian CP 3800 GC) equipped with a Nukol capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and a flame ionisation detector. The carrier gas was helium. The temperature of the injector was 250 °C and the temperature of the oven was initially set at 150 °C for 3 min and thereafter increased to 180 °C.

#### **7.2.5. FTIR spectroscopy**

Samples of substrate and digestates were dried at 105 °C in a furnace for 48 h and then ground in a laboratory ball mill (Retsch mill model MM200). 2 mg subsample along with 200 mg KBr (FTIR grade) were homogenised in an agate mortar. FTIR spectra were recorded using KBr-sample pellets pressed under vacuum, in a standard device under pressure of 6000 kg cm<sup>-1</sup> for 10 min. Samples were analysed using a FTIR Perkin-Elmer 2 000 spectrophotometer over the 4 000–400 cm<sup>-1</sup> range at a rate of 0.5 cm s<sup>-1</sup>. Fifty scans were recorded, averaged for each spectrum and corrected against ambient air as background as described by Cuetos et al. [29].

#### **7.2.6. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy**

Samples were prepared and analysed in a Bruker Avance 600 spectrometer (5 mm TCi cryoprobe, inverse detection) according to the methodology described by Gómez et al. [20]. Digestate samples were obtained from the thermophilic SBR working under single stage configuration (HRT of 8.3 days) and two-stage configuration (HRTs of 25, 16.7 and 12.5 days).

### 7.3. RESULTS AND DISCUSSION

Chemical characteristics of the substrate and inoculum used during the start-up phase of the thermophilic SBR are shown in Table 7.1. The substrate has low content in nitrogen and alkalinity. CW is highly biodegradable since it is mainly composed by lactose. With regard to the inoculum, the solid content was low since it was kept in ambient storage to eliminate background biogas production prior to starting the experiment. The inoculum was characterised by an alkalinity value of  $1.8 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ , which may be considered as high enough to neutralise possible VFA accumulation at low OLR. However, preliminary experiments (data not shown) of CW digestion resulted in high VFA build-up and severe pH drop.

*Table 7.1. Characteristics of the substrate and inoculum.*

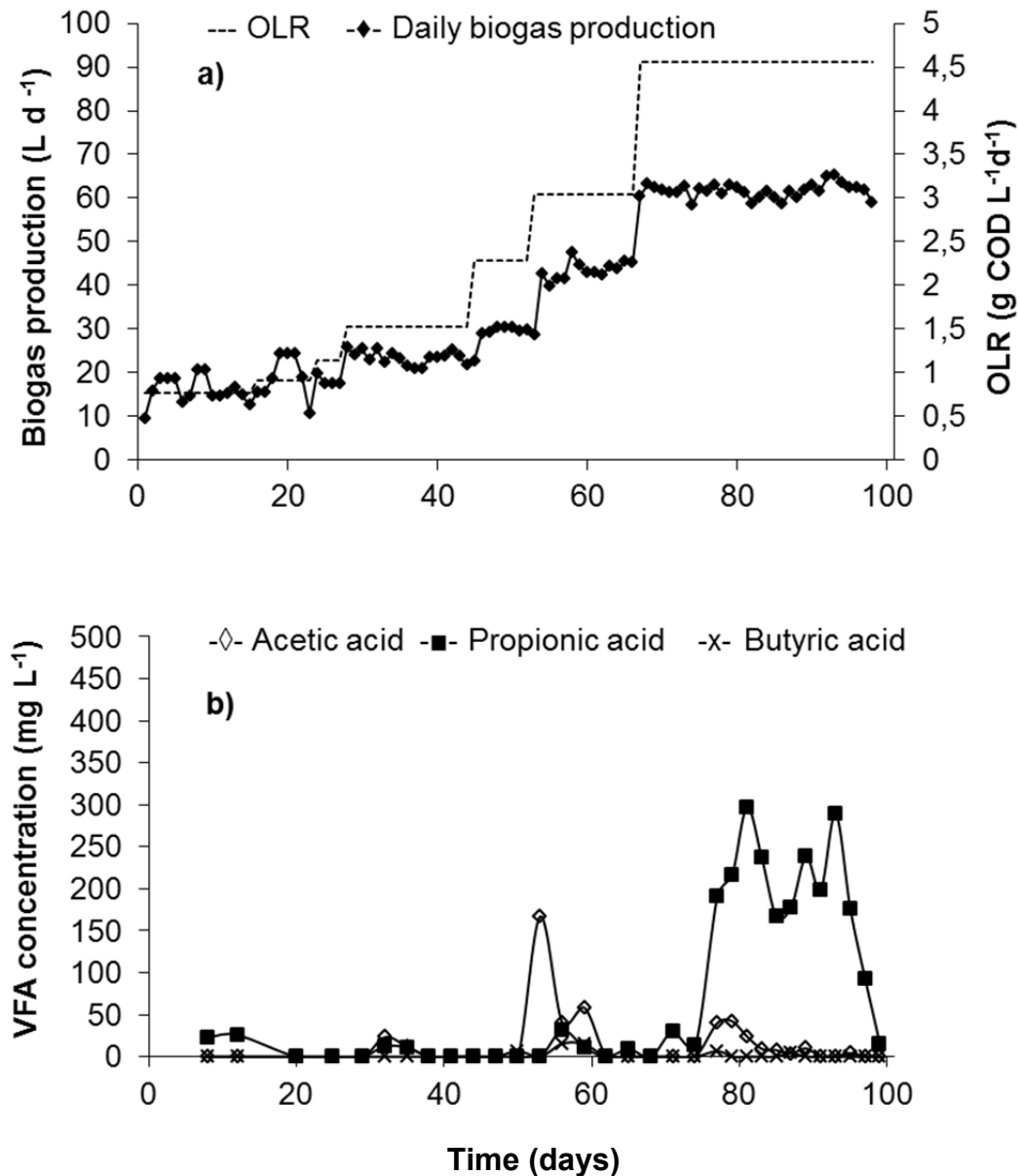
Parameters	Units	CW	Inoculum
TS	(g L <sup>-1</sup> )	33.1 ± 0.1	18.3 ± 0.1
VS	(g L <sup>-1</sup> )	30.1 ± 0.1	9.1 ± 0.1
COD	(g L <sup>-1</sup> )	38.0 ± 1.4	-
Alkalinity	(g L <sup>-1</sup> )	0.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2
KN	(g L <sup>-1</sup> )	0.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1
TP	(g L <sup>-1</sup> )	-	0.5 ± 0.1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	(mg L <sup>-1</sup> )	26 ± 15	578 ± 21
Na <sup>+</sup>	(mg L <sup>-1</sup> )	167 ± 10	49.8 ± 9.1
K <sup>+</sup>	(mg L <sup>-1</sup> )	639 ± 30	19.1 ± 5.2
Cl <sup>-</sup>	(mg L <sup>-1</sup> )	487 ± 20	-
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	(mg L <sup>-1</sup> )	655 ± 20	-
SO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	(mg L <sup>-1</sup> )	67 ± 23	-
NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	(mg L <sup>-1</sup> )	< 10	-
Lactose	(g L <sup>-1</sup> )	27.1 ± 2.5	-
Lactic Acid	(g L <sup>-1</sup> )	0.6 ± 0.3	-

### 7.3.1 Single stage anaerobic digestion of cheese whey

The daily biogas production is represented in Figure 7.2 a. The OLR was gradually increased from 0.8 to 1.5 g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> during the adaptation period (30 days). The reactor responded with a concomitant improvement in biogas production whenever load increments were applied. The HRT was successfully reduced to 8.3 days and these operating conditions were maintained during 4 consecutive HRTs. At this stage, the average value of biogas production was 61.6 ± 1.3 L d<sup>-1</sup> (Table 7.2). The content of CH<sub>4</sub> in biogas was in the range of 50–60% and the average SMP was 314.5 ± 6.6 L CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> COD<sub>feed</sub> (397.0 ± 8.1 L CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> VS). Results here obtained are higher than those reported by Rugele et al. [8] who evaluated the digestion of CW in a mesophilic system at high organic loading rates (4.9 kg VS m<sup>-3</sup>) obtaining SMP in the range of 176–278 L kg<sup>-1</sup> VS with no apparent acid inhibition on methanogenic microbial population.

A COD removal efficiency of 87.4% was obtained when the clarified effluent is used for calculating the efficiency. This result is lower than those reported by Yang et al. [30], who obtained a value of 94.6% for COD removal efficiencies using a thermophilic continuously stirred tank reactor (CSTR) treating CW wastewater (COD 10 000 mg L<sup>-1</sup>) with an HRT of 10 days. On the contrary, Saddoud et al. [7] obtained lower COD removal efficiencies (79%) when treating CW in a mesophilic anaerobic membrane reactor with phase separation.

In the present experiment, the pH of the reactor was around 7 units and there was no need of adding any alkaline solution. The average alkalinity of the effluent, measured at the lowest HRT tested, was 1 388 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Levels of ammonia were maintained amongst 240–280 mg L<sup>-1</sup> thanks to the supplement of urea to the reactor.



**Figure 7.2.** Anaerobic digestion of cheese whey. Daily biogas production and OLR applied (a); VFAs content (b).

The concentration of VFA is represented in Figure 7.2 b. Low values of volatile intermediaries confirm the stable performance of the digestion process. Propionic and acetic acid were the most abundant, with maximum values of 300 and 170 mg L<sup>-1</sup> respectively. The decrease to an HRT of 8.3 days resulted in an increase in VFA, but values were far from suggesting acidification problems.

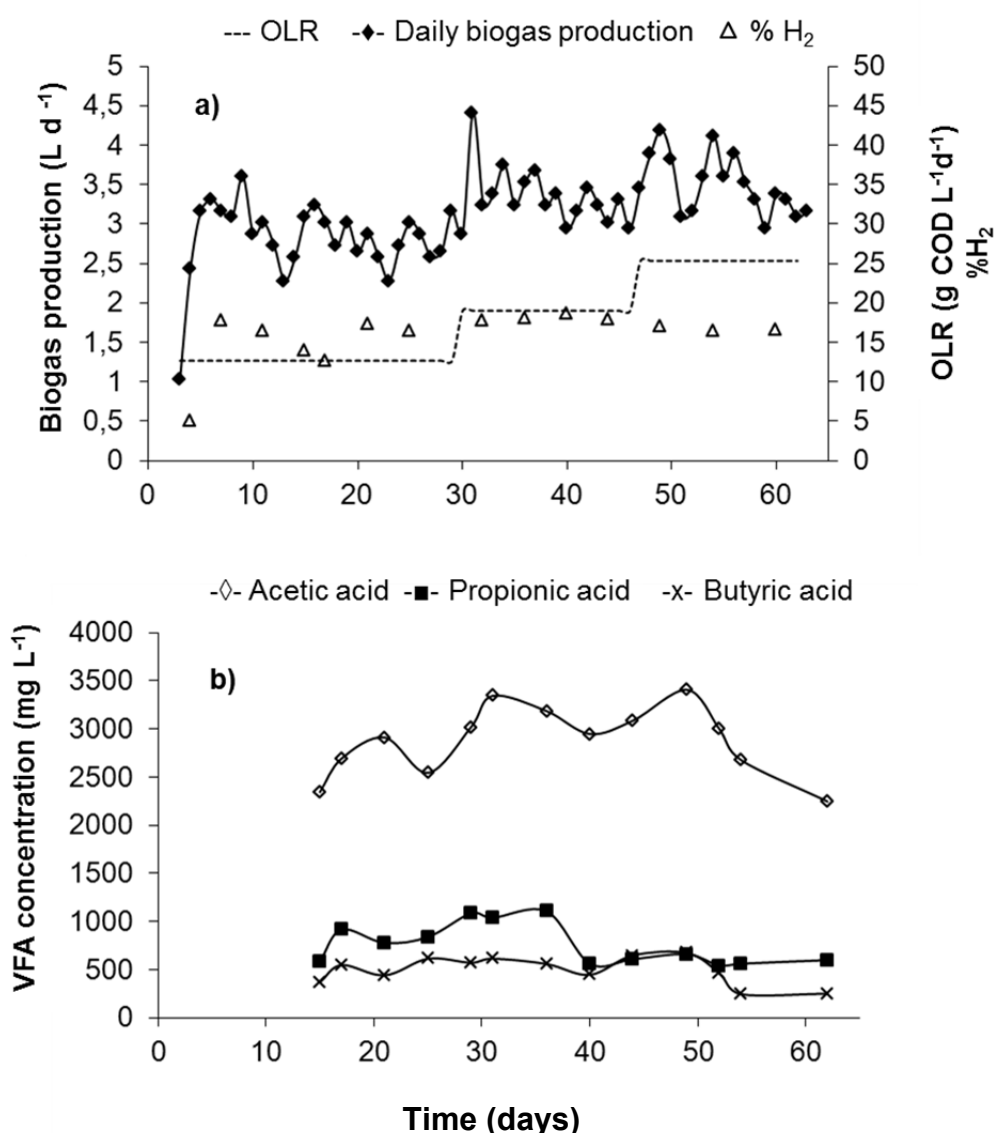
**Table 7.2.** Experimental results during the anaerobic digestion of cheese whey.

Period	1	2	3	4
<b>HRT (d)</b>	25	16.7	12.5	8.3
<b>OLR (g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	1.5 ± 0.2	2.3 ± 0.3	3.0 ± 0.3	4.6 ± 0.3
<b>Biogas production (L d<sup>-1</sup>)</b>	22.7 ± 1.3	29.6 ± 0.7	40.9 ± 1.2	61.6 ± 1.3
<b>% CH<sub>4</sub></b>	52.3 ± 3.2	56.0 ± 2.1	58.0 ± 1.8	58.2 ± 2.1
<b>SMP (L CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> COD)</b>	312.4 ± 18.4	290.8 ± 6.9	312.1 ± 9.1	314.5 ± 6.6
<b>Alkalinity (mg CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>)</b>	1730.0 ± 126.0	1324.0 ± 157.5	1286.0 ± 110.3	1388.0 ± 113.9
<b>[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (mg L<sup>-1</sup>)</b>	298.5 ± 45.4	216.9 ± 43.0	198.0 ± 12.7	232.0 ± 46.2
<b>COD (g O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	14.6 ± 1.2	15.6 ± 2.6	13.4 ± 1.3	14.7 ± 1.0
<b>VS (g L<sup>-1</sup>)</b>	9.7 ± 0.8	10.2 ± 0.5	10.3 ± 0.4	10.6 ± 0.6
<b>% VS</b>	56.6 ± 0.9	56.7 ± 1.0	57.9 ± 0.8	53.0 ± 1.0
<b>COD<sub>effluent</sub> (g O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	4.9 ± 1.1	4.7 ± 0.7	5.4 ± 0.4	4.8 ± 1.0
<b>VS<sub>effluent</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	2.7 ± 0.4	3.3 ± 0.1	3.6 ± 0.2	4.1 ± 0.3
<b>% VS<sub>effluent</sub></b>	46.2 ± 3.5	51.3 ± 1.1	55.4 ± 4.0	53.9 ± 3.3
<b>pH</b>	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.1 ± 0.1

### 7.3.2 Two-stages anaerobic digestion

#### 7.3.2.1. Operation of H<sub>2</sub> producing reactor

Figure 7.3 a, shows the time course of biogas production. H<sub>2</sub> content in biogas was below 20% during the whole operation of the reactor, while no CH<sub>4</sub> was detected. The pH of the reactor was kept in the range of 4.5–5.5 units by means of alkaline addition.



**Figure 7.3.** H<sub>2</sub> reactor of the two-stage process. Daily biogas production, OLR applied and H<sub>2</sub> content (a); VFAs content (b).

An increase in daily biogas production was observed with the decrease in HRT, although this was not directly linked to the higher OLR applied. As a result, the specific H<sub>2</sub> production (SH<sub>2</sub>P) was negatively affected. Therefore, the highest SH<sub>2</sub>P value was  $12.0 \pm 0.9$  L kg<sup>-1</sup> COD<sub>feed</sub> which was obtained at the highest HRT (Table 7.3). The production of H<sub>2</sub> here obtained was lower than results reported in literature. Venetsaneas et al. [31], obtained a maximum H<sub>2</sub> production rate of 2.9 L H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> for an OLR of 60 g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and an HRT of 24 h. Furthermore, Yang et al. [32] studied the H<sub>2</sub> production from CW permeate powder solutions, using mixed microbial



communities under mesophilic conditions. For an OLR of 10 g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and an HRT of 24 h they obtained a maximum H<sub>2</sub> rate of 0.47 L H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

With regard to soluble metabolites, the main VFA detected was acetic acid with a concentration range between 2 344–3 405 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 3b). This compound is usually reported to be one of the dominant metabolic products, along with lactic and butyric acid [13, 33]. Propionic acid was the second metabolic product measured in the present study. This acid was produced as a result of a non-hydrogen producing pathway [34].

The decrease in HRT also resulted in a decrease in acetic and butyric acid concentration which was associated with a detriment in the SH<sub>2</sub>P. Since the start-up of the reactor was carried out using indigenous cultures, the type of metabolic products as well as the rate of H<sub>2</sub> production depends on the dominant microbial species initially present in CW and their metabolic pathway under prevailing conditions [25]. Results from measurements of organic acids suggested the prevalence of propionic bacteria and a low proportion of H<sub>2</sub> producers via the butyric pathway which could explain the low production of this gas. However, acetic acid was continuously produced. This may be rationalised by the presence of homoacetogenic bacteria that are able to grow autotrophically and produce acetate from H<sub>2</sub> and carbon dioxide as the only energy and carbon sources.

*Table 7.3. Performance of the Hydrogen reactor*

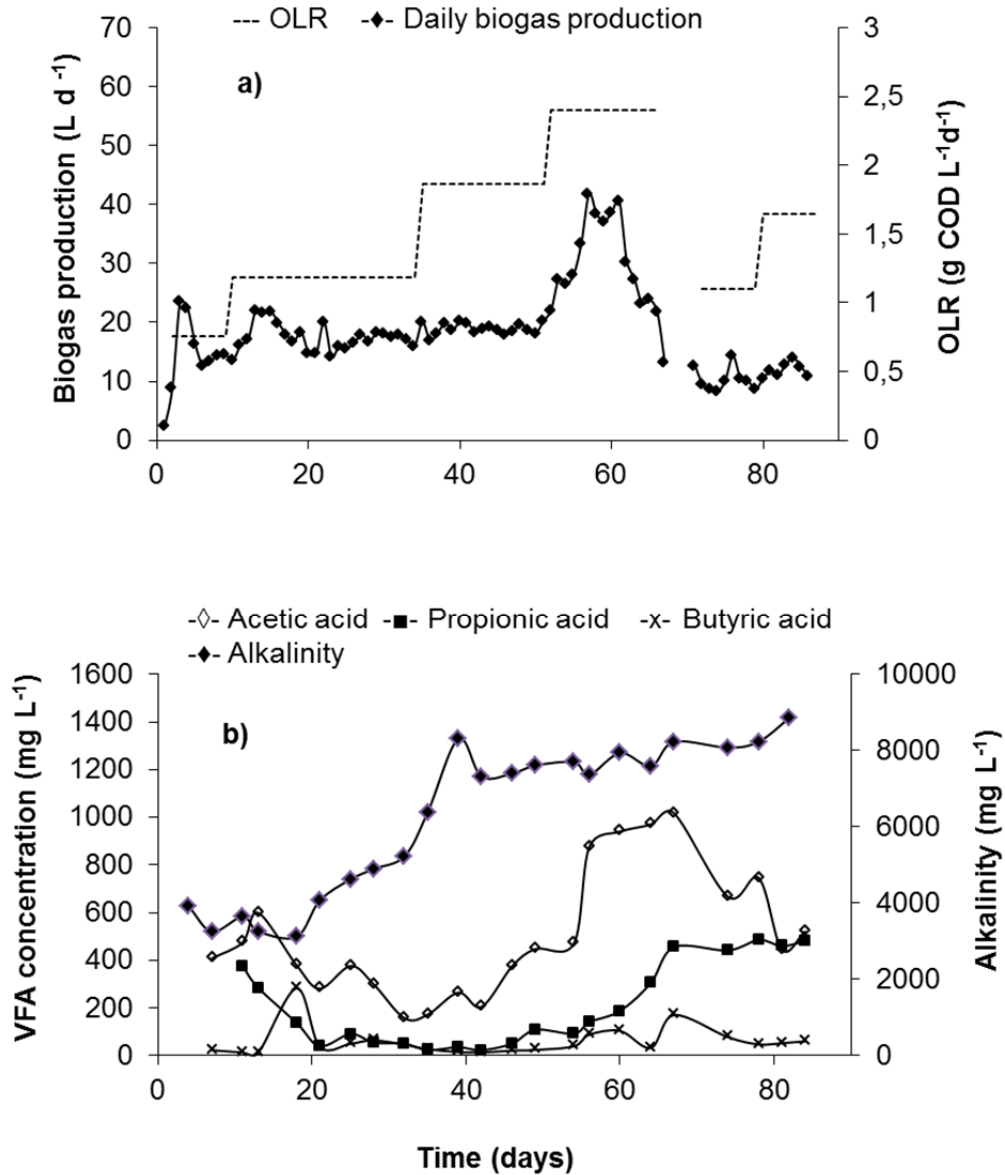
Period	1	2	3
<b>HRT (d)</b>	3	2	1.5
<b>OLR (g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	12.7	19	25.3
<b>Biogas production (L d<sup>-1</sup>)</b>	2.9 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2
<b>H<sub>2</sub> (%)</b>	16.4 ± 0.6	18.2 ± 0.3	16.6 ± 0.2
<b>COD (g L<sup>-1</sup>)</b>	29.6 ± 2.6	31.1 ± 1.4	29.9 ± 2.7
<b>VS (g L<sup>-1</sup>)</b>	17.9 ± 1.8	19.9 ± 0.5	19.9 ± 1.4
<b>% VS</b>	61.8 ± 0.6	62.9 ± 0.3	65.7 ± 0.9
<b>H<sub>2</sub> rate (L L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	0.15 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01
<b>SH<sub>2</sub>P (L kg<sup>-1</sup> COD)</b>	12.0 ± 0.9	10.0 ± 0.8	7.3 ± 0.3

### 7.3.2.2. Digestion as second stage

The digestion stage initially experienced an increase in biogas production when operating at an HRT of 25 days and using as feeding the acid effluent from the H<sub>2</sub> producing reactor (Fig. 7.4 a). The biogas production had a maximum value of 21.9 L d<sup>-1</sup> but was then followed by a slight decrease until reach an average value of 17.1 ± 0.9 L d<sup>-1</sup> (SMP of 349 ± 20 L CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> COD<sub>feed</sub>) and methane content of 60.5 ± 0.1% (Table 7.4).

The decrease in HRT to 16.7 days did not represent any significant increase in biogas production. During this period, the average value of biogas production was 19.0 ± 0.7 L d<sup>-1</sup> and a reduction in CH<sub>4</sub> content to 55.8% was observed, resulting in a decrease in SMP to 248.4 ± 12.4 L CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> COD<sub>feed</sub>. A further increase in the feeding rate (HRT of 12.5 d and OLR of 2.3 g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) was performed; resulting in a maximum value of biogas production of 41 L d<sup>-1</sup> but this behaviour was accompanied by a drastic drop in pH as acidification took place. The pH in this reactor was in the range of 7.2–7.7 during the previous experimental periods, but when operating at an HRT of 12.5 days a steep drop to 6.5 units was registered.

VFA presented higher values in this experimental phase when compared to those obtained when operating as a single stage configuration. From Figure 7.4 b, is observed an increasing trend in VFA concentration. This accumulation was mainly caused by the inability of methanogens to convert all organic acids entering with the influent. The excessive VFA caused a pH drop along with inhibitory conditions which may explain the failure of the process. In addition to acetic acid accumulation, propionic acid build-up was also noticed. The highest concentration detected was 1 017 mg L<sup>-1</sup> of acetic and 455 mg L<sup>-1</sup> of propionic acid. These values were below the threshold levels for considering the inhibition of the digestion process, since a value as high as 3 000 mg L<sup>-1</sup> of acetic was regarded as responsible for methanogenic toxicity [35]. On the other hand, previous studies have shown that propionic acid at a concentration of 900 mg L<sup>-1</sup> has resulted in decreased methanogenic growth rates and thus methane yields [36].



**Figure 7.4.**  $CH_4$  reactor of the two-stage process. Daily biogas production and OLR applied (a); VFAs content and alkalinity (b).

Based on the poor performance of the process feeding was interrupted during 5 days to allow the recovery of the digestion system. Operation was subsequently resumed at an HRT of 25 days and later to 16.7 days but no improvement was observed. Acetic acid content was reduced, allowing the recovery of pH values to 7.1–7.3 units. However, the concentration of propionic acid remained almost invariable suggesting a shift in metabolic pathways and as a consequence a reduction of propionic consumption.

It was remarkable the increase in alkalinity from values of 3 600 up to 8 228  $mg\ L^{-1}$  (Fig. 7.4 b) due to the regulation of pH in the preceding reactor. The daily average dosage of alkalinity resulted in an increase in sodium and potassium content in the acid effluent. It seems that methanogens were not able to adapt to these conditions, although previous works reported on successful fermentation at higher levels of alkalinity, ca. 12 750  $mg\ CaCO_3\ L^{-1}$  [25]. Previous research has already described that methanogenic bacteria exhibit greater sensitivity to toxics than acidogenic bacteria. Salt toxicity generally results in a rapid increase in VFA and a sudden decrease or cease in biogas production [37]. In this case, the digester failure could be explained by the combined effect of potassium, sodium and VFA build-up. Analysis performed at the end of the experiment reported a concentration of 6 550 ppm of potassium and 1 600 ppm of sodium in the anaerobic liquor.

Anaerobic toxicity assays carried out under batch conditions and using as substrate a mixture of VFAs (2  $g\ L^{-1}$  acetate, 0.5  $g\ L^{-1}$  butyrate and 0.5  $g\ L^{-1}$  propionate) revealed that a sodium concentration of 3  $g\ L^{-1}$  reduced the methanogenic activity by 50% compared to the blank [38]. Onodera et al. [39], evaluated cation inhibition during anaerobic degradation of molasses wastewater. 50% inhibition values were obtained at 12  $g\ K\ L^{-1}$  and 9  $g\ Na\ L^{-1}$ . Jard et al. [40], observed inhibition by sodium and potassium in semi-continuous mode at 13.0  $g\ L^{-1}$  for potassium and 4.1  $g\ L^{-1}$  for sodium. Different inhibition levels were attributed to differences in the sensitivity between microorganisms, and differences in the test method. In any case, values reported in the present study are far below any of these thresholds, thereby indicating that probably a combined effect is the cause of the inhibition observed.

**Table 7.4.** Performance of the methane reactor

Period	1	2	3
<b>HRT (d)</b>	25 <sup>(1)</sup>	16.7 <sup>(2)</sup>	12.5 <sup>(3)</sup>
<b>OLR (g COD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	1.2 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.4 ± 0.2
<b>Biogas production (L d<sup>-1</sup>)</b>	17.1 ± 0.8	19.0 ± 0.7	39.3 ± 1.8
<b>% CH<sub>4</sub></b>	60.5 ± 0.1	55.8 ± 0.2	51.8 ± 0.1
<b>SMP (L CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> COD<sub>feed</sub>)</b>	349.5 ± 20	248.4 ± 12.4	340.4 ± 40
<b>Alkalinity (mg CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>)</b>	5499 ± 777.3	7504 ± 147.1	7936 ± 131.2
<b>[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (mg L<sup>-1</sup>)</b>	166.8 ± 36.6	181.5 ± 23.3	240 ± 21.1
<b>COD (g O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	14.1 ± 1.5	14.5 ± 1.2	13.8 ± 1.1
<b>VS (g L<sup>-1</sup>)</b>	10.2 ± 1.5	11.0 ± 0.9	10.3 ± 0.6
<b>% VS</b>	38.1 ± 3.1	39.4 ± 2.3	39.3 ± 2.7
<b>COD<sub>effluent</sub> (g O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>	7.7 ± 0.9	10.4 ± 0.7	9.8 ± 0.7
<b>VS<sub>effluent</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	6.4 ± 0.7	8.4 ± 0.4	7.8 ± 0.4
<b>% VS<sub>effluent</sub></b>	39.4 ± 2.1	39.7 ± 0.6	37.9 ± 0.4
<b>pH</b>	7.7 ± 0.1	7.6 ± 0.1	7.2 ± 0.1

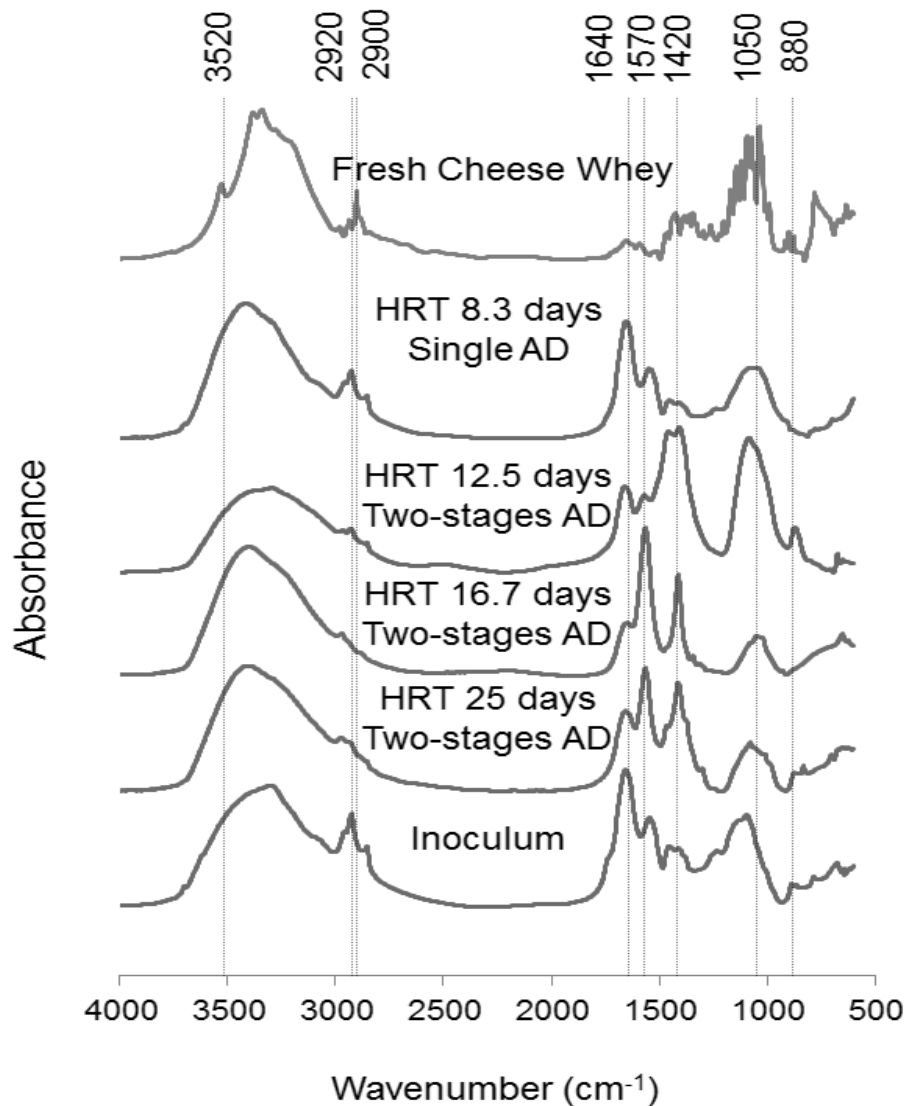
<sup>1</sup> Average values and standard deviation for operational parameters for days 25-35.

<sup>2</sup> Average values and standard deviation for operational parameters for days 42-52.

<sup>3</sup> Average values and standard deviation for operational parameters for days 57-61.

### 7.3.3. FTIR analysis

Figure 7.5, shows FTIR spectra obtained from samples of substrate, inoculum and different digestates. The spectrum obtained from the CW sample presents a broad O-H absorption band which is characterised by an asymmetry around 3 520 cm<sup>-1</sup> associated to N-H stretching from amides and amines [41] in proteins. Even though CW was pre-treated by a membrane separation unit, some proteins at low concentration are still present. The most complex region of the spectra appears in the range 1 500–600 cm<sup>-1</sup>, known as “fingerprint region”. Among others, it includes the band ascribed to polysaccharides [42]. The CW sample presents strong absorption bands in this region and in particular at 1 075–1 042 cm<sup>-1</sup> (characteristics peaks in lactose).



**Figure 7.5.** FTIR spectra of cheese whey, inoculum and digested samples.

The effect of digestion is reflected mainly on digestate samples with the increase in signals ascribed to the protein region. The peak at  $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$  has high intensity and it is well defined in the spectrum of the inoculum and digestate sample (at 8.3 days HRT) when operating as single stage. In this case, this peak presented higher relative intensity when compared with the carbohydrate region, but this is not the case for samples obtained from the thermophilic SBR when digesting the acid stream. In this later case, spectra are characterised by a decrease in the intensity of signal at  $1\ 640$  against  $1\ 570\ \text{cm}^{-1}$  (both characteristics of N-H amide stretching). This behaviour was associated to the poor performance of the reactor. The decrease in HRT resulted not only in VFA accumulation, but also in an increase of unsaturated compounds ( $1\ 420\ \text{cm}^{-1}$ ) and incomplete degradation of the organic matter which is reflected in an increase in the

relative intensity of the polysaccharide region. This is the reason of the increasing trend of the signal around 1 050 cm<sup>-1</sup> ascribed to C-O-C stretching of polysaccharides, which increased significantly when the second digestion phase was evaluated at lower HRT.

#### 7.3.4. <sup>1</sup>HNMR Analysis

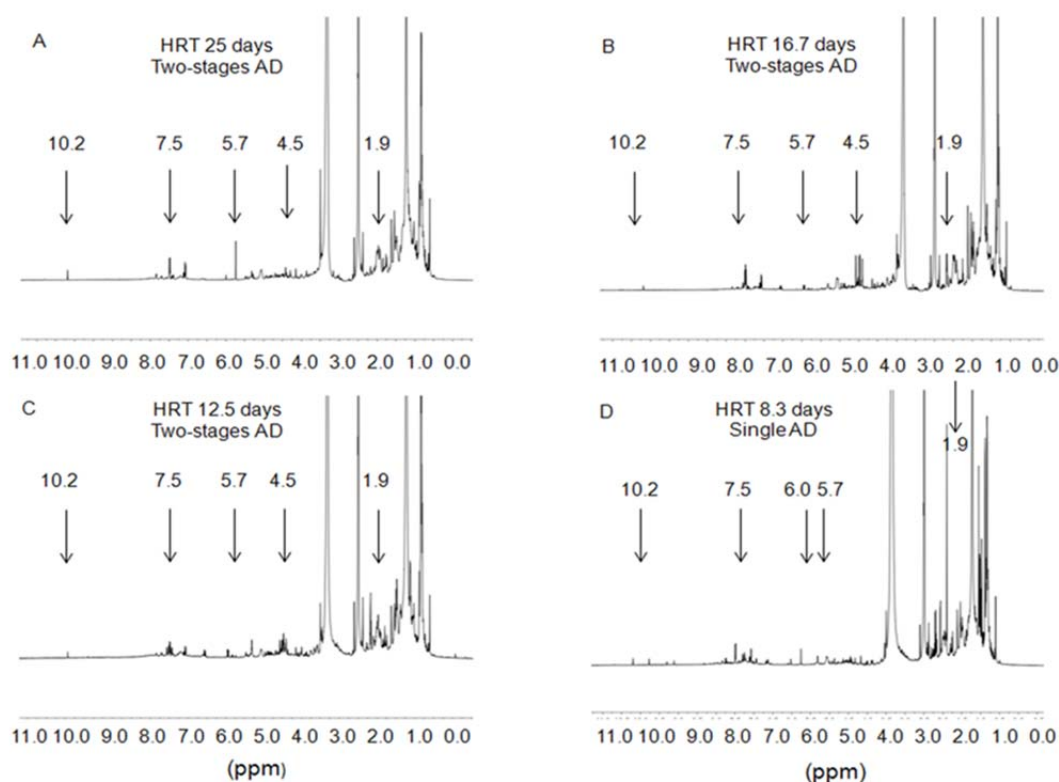
Three distinct zones are distinguished in spectra: aromatic, aliphatic and unsaturated compounds. The triple signal at 2.5 ppm corresponded to DMSO-d<sub>6</sub> (Fig. 7.6 ). The region at 3.3–3.35 was derived from the presence of water due to hydration of the sample during preparation and storage.

Spectra were characterised by high intensity peaks in the aliphatic region, with the main signal placed at 1.22 ppm and ascribed to –CH<sub>2</sub>– groups. Signals at 0.6 and 0.8 ppm ascribed to terminal methylenes also present high intensities. The presence of these functional groups is associated to the core lipids of archaea, which are characterised by a hydrophobic portion which consists of chains of isoprene molecules with regularly branching methyl groups and are covalently bound to glycerol molecules through etherbonds [43].

No relevant modifications in the relative intensities of methylene and ethylene groups can be observed when operating at varying conditions during the thermophilic SBR as second stage. During the digestion experiment, the decrease in HRT was associated with lower values of SMP due to VFA build-up and incomplete degradation of the organic matter. Nevertheless, the operation as a single stage was carried out successfully at an HRT of 8.3 days without evidencing any type of inhibitory conditions. The sample obtained under this configuration was characterised by higher diversity of methylene groups as it can be observed by the variety of signals in the region 0.6–0.9 ppm (Fig. 7.6 D).

A relative increase in the intensity of signal at 4.5 ppm compared to the one at 1.9 ppm (protons adjacent to olefinic groups) is observed in Figures 7.6 B and 7.6 C. The signal about 4.5 ppm was ascribed to protons in triacylglycerol groups [44] and the relative increase in intensity was associated to the operation of the reactor as second stage digestion process. This behaviour may be rationalised as a shift of microbial

population as a response to a higher salinity environment due to the feeding of the acid effluent into the reactor. Thus, the lipid material extracted from this sample probably presented significant variations in the content of caldarchaeols and archaeols species as a result of halophilic conditions in the reactor. Even though changes in microbial populations can be hypothesised by the NMR spectra obtained from samples taken at different HRTs, the performance of the reactor was deteriorated and microbial shift was not enough to prevent reactor failure



**Figure 7.6.** <sup>1</sup>H NMR spectra of thermophilic digested samples. Two-stages HRT 25 days (A), Two-stages HRT 16.7 days (B), Two-stages HRT 12.5 days (C) and single stage HRT 8.3 days (D).

## 7.4. CONCLUSIONS

Thermophilic anaerobic digestion of CW was successfully achieved at an HRT of 8.3 days. The evaluation of the process under two-stage configuration (H<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub>) resulted in the need of higher HRT (12.5 days) for the digestion reactor. VFAs build-up was observed in this reactor as a response to inhibitory conditions. The presence of a



first H<sub>2</sub> producing phase resulted in an increase in the alkalinity and salinity of the second stage digestion system. FTIR and <sup>1</sup>H NMR spectra obtained from the second stage digestion process (at an HRT of 12.5 days) revealed the presence of lipid structures representing microbial population shift to better adapt to halophilic conditions. Dominant methanogens were characterised by a lipid core structure rich in triacylglycerol groups as a response to higher salinity environment. However, these microorganisms presented lower capacity for degrading the substrate.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was possible thanks to the financial support of the Spanish Ministry of Science and Innovation through project Ref. Number ENE2009-10395, for funding and for the FPI fellowship granted.

## 7.5. REFERENCES

- [1] Durruty I, Zaritzky NE, González JF. Organic fractions influence on biogas generation from potato residues. Kinetic model generalization. *Biomass Bioenerg* 2013; 59: 458-67.
- [2] Molino A, Nanna F, Ding Y, Bikson B, Braccio G. Biomethane production by anaerobic digestion of organic waste. *Fuel* 2013; 103: 1003–9.
- [3] M.I.González S. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour Technol* 1996; 57: 1–11.
- [4] Rosales-Colunga L, Razo-Flores E, Ordoñez LG, Alatraste-Mondragon F, De Leon-Rodriguez A. Hydrogen production by *Escherichia coli* ΔhycA ΔlacI using cheese whey as substrate. *Int J Hydrogen Energy* 2010; 35: 491–9.
- [5] Ozmihci S, Kargi F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme Microb Technol* 2007; 41: 876–80.

- [6] Ghaly AE. A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two-stage reactor. *Bioresour Technol* 1996; 58: 61–72.
- [7] Saddoud A, Hassaïri I, Sayadi S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresour Technol* 2007; 98: 2102–8.
- [8] Rugele K, Mezule L, Dalecka B, Larsson S, Vanags J, Rubulis J. Application of fluorescent in situ hybridisation for monitoring methanogenic archaea in acid whey anaerobic digestion. *Agronomy Research* 2013; 11: 373–80.
- [9] Fernández FJ, Villaseñor J, Infantes D. Kinetic and stoichiometric modelling of acidogenic fermentation of glucose and fructose. *Biomass Bioenergy* 2011; 35: 3877–83.
- [10] Gómez X, Fernández C, Fierro J, Sánchez ME, Escapa A, Morán A. Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation. *Bioresour Technol* 2011; 102: 8621–7.
- [11] Fernández C, Carracedo B, Martínez EJ, Gómez X, Morán A. Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: Effect of organic loading rate. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 2014; 49: 210–7.
- [12] Rosales-Colunga LM, García RG, De León Rodríguez A. Estimation of hydrogen production in genetically modified *E. coli* fermentations using an artificial neural network. *Int J Hydrogen Energy* 2010; 35: 13186–92.
- [13] Azbar N, Çetinkaya Dokgöz FT, Keskin T, Korkmaz KS, Syed HM. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *Int J Hydrogen Energy* 2009; 34: 7441–7.
- [14] Lee D, Ebie Y, Xu K, Li Y, Inamori Y. Continuous H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. *Bioresour Technol* 2010; 101: S42–7.

- [15] Kyazze G, Dinsdale R, Guwy AJ, Hawkes FR, Premier GC, Hawkes DL. Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnol Bioeng* 2007; 97: 759–70.
- [16] Song Y, Kwon S, Woo J. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water Res* 2004; 38: 1653–62.
- [17] Golkowska K, Greger M. Anaerobic digestion of maize and cellulose under thermophilic and mesophilic conditions – A comparative study. *Biomass Bioenerg* 2013; 56: 545–54.
- [18] Suwannopadol S, Ho G, Cord-Ruwisch R. Rapid start-up of thermophilic anaerobic digestion with the turf fraction of MSW as inoculum. *Bioresour Technol* 2011; 102: 7762–7.
- [19] Francioso O, Ferrari E, Saladini M, Montecchio D, Gioacchini P, Ciavatta C. TG-DTA, DRIFT and NMR characterisation of humic-like fractions from olive wastes and amended soil. *J Hazard Mater* 2007; 149: 408–17.
- [20] Gómez X, Blanco D, Lobato A, Calleja A, Martínez-Núñez F, Martín-Villacorta J. Digestion of cattle manure under mesophilic and thermophilic conditions: characterization of organic matter applying thermal analysis and <sup>1</sup>H NMR. *Biodegradation* 2011; 22: 623–35.
- [21] Tambone F, Adani F, Gigliotti G, Volpe D, Fabbri C, Provenzano MR. Organic matter characterization during the anaerobic digestion of different biomasses by means of CPMAS <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Biomass Bioenerg* 2013; 48: 111–20.
- [22] Grube M, Lin JG, Lee PH, Kokorevicha S. Evaluation of sewage sludge-based compost by FT-IR spectroscopy. *Geoderma* 2006; 130: 324–33.
- [23] Adani F, Genevini P, Tambone F, Montoneri E. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere* 2006; 65: 1414–8.

- [24] Antonopoulou G, Stamatelatou K, Venetsaneas N, Kornaros M, Lyberatos G. Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process. *Ind Eng Chem Res* 2008; 47: 5227–33.
- [25] Venetsaneas N, Antonopoulou G, Stamatelatou K, Kornaros M, Lyberatos G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour Technol* 2009; 100: 3713–7.
- [26] Speece RE. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 1983; 17: 416A–27A.
- [27] Álvarez JA, Otero L, Lema JM. A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. *Bioresour Technol* 2010; 101: 1153–8.
- [28] APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, D.C.: USA American Public Health Association/American Water Works Association/ Water Environment Federation; 1998.
- [29] Cuetos MJ, Gómez X, Martínez EJ, Fierro J, Otero M. Feasibility of anaerobic co-digestion of poultry blood with maize residues. *Bioresour Technol* 2013; 144: 513-20.
- [30] Yang K, Yu Y, Hwang S. Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. *Water Res* 2003; 37: 2467–77.
- [31] Venetsaneas N, Antonopoulou G, Stamatelatou K, Kornaros M, Lyberatos G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour Technol* 2009; 100: 3713–7.
- [32] Yang P, Zhang R, McGarvey JA, Benemann JR. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int J Hydrogen Energy* 2007; 32: 4761–71.

- [33] Antonopoulou G, Stamatelatou K, Venetsaneas N, Kornaros M, Lyberatos G. Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process. *Ind Eng Chem Res* 2008; 47: 5227–33.
- [34] Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes DL. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int J Hydrogen Energy* 2007; 32: 172–84.
- [35] Ahring BK, Sandberg M, Angelidaki I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995; 43: 559–65.
- [36] Wang Y, Zhang Y, Wang J, Meng L. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass Bioenerg* 2009; 33: 848–53.
- [37] Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour Technol* 2008; 99: 4044–64.
- [38] Feijoo G, Soto M, Méndez R, Lema JM. Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaptation phenomena. *Enzyme Microb Technol* 1995; 17: 180–8.
- [39] Onodera T, Sase S, Choeisai P, Yoochatchaval W, Sumino H, Yamaguchi T, et al. Development of a treatment system for molasses wastewater: The effects of cation inhibition on the anaerobic degradation process. *Bioresour Technol* 2013; 131: 295–302.
- [40] Jard G, Jackowiak D, Carrère H, Delgenes JP, Torrijos M, Steyer JP, et al. Batch and semi-continuous anaerobic digestion of *Palmaria palmata*: Comparison with *Saccharina latissima* and inhibition studies. *Chem Eng J* 2012; 209: 513–9.
- [41] de Oliveira Silva J, Filho GR, da Silva Meireles C, Ribeiro SD, Vieira JG, da Silva CV, et al. Thermal analysis and FTIR studies of sewage sludge produced in treatment plants. The case of sludge in the city of Uberlândia-MG, Brazil. *Thermochimica Acta* 2012; 528: 72–5.

- [42] Martínez EJ, Fierro J, Sánchez ME, Gómez X. Anaerobic co-digestion of FOG and sewage sludge: Study of the process by Fourier transform infrared spectroscopy. *Int Biodeterior Biodegrad* 2012; 75: 1–6.
- [43] Matsumi R, Atomi H, Driessen AJM, van der Oost J. Isoprenoid biosynthesis in Archaea – Biochemical and evolutionary implications. *Res Microbiol* 2011; 162: 39–52.
- [44] Dais P, Hatzakis E. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. *Anal Chim Acta* 2013; 765: 1-27.

## *Capítulo 8*

# *Anaerobic co-digestion of sewage sludge with cheese whey under thermophilic and mesophilic conditions*

**International Journal of Energy Engineering 4 (2014) 26-31**

**Camino Fernández, Daniel Blanco, Julio Fierro, Elia Judith Martínez and  
Xiomar Gómez**





**Abstract**

Anaerobic digestion of sewage sludge (SS) and co-digestion with cheese whey (CW) was evaluated in batch conditions under mesophilic and thermophilic regimens. Results indicated that the co-digestion can be successfully attained despite some inhibitory stages that may be initially present due to the accumulation of volatile fatty acids. Degradation of the mixture SS-CW followed a similar pattern without influence of the temperature. Tests in thermophilic conditions were performed better, with the absence of inhibitory stages associated with fatty acids accumulation. Moreover, a significant increase in the rate of biogas production was obtained along with a great reduction of the time necessary for digestion. However, lower methane yields were obtained under thermophilic temperatures.

## 8.1. INTRODUCTION

The biological treatment of municipal wastewater has significantly improved the quality of environment. However, the disposal of sludge is still a problem of growing importance, representing up to 50% of the current operating costs of a wastewater treatment plant (WWTP) [1].

Anaerobic digestion is a suitable technology for attaining the reduction of the putrefaction potential of sludge. This technology produces biosolids as by-product, which are susceptible of valorisation by land application as long as legal restrictions are fulfilled. Biogas is usually valorised by means of energy and/or heat generation. Anaerobic digestion is the most widely biological method used for the stabilisation of sewage sludge (SS) [2] and it is expected to remain one of the most widely applied technologies in the near future due to the reduction in emission of greenhouse gases [3]. In addition, biosolids have strong fertilising value and may cover part or all of the nutrient requirements of crops [4].

The digestion of SS has been usually characterised by low volumetric productions of biogas due to the inherent difficulties in digesting secondary sludge which present a lower methane yield than that of primary sludge [5]. Different pre-treatment options have been studied with the aim of reducing the time needed for digestion of waste activated sludge (WAS), and increasing the biogas yield [6]. Mechanical, chemical and thermal pre-treatments, the application of ultrasounds [7], and more recently the use of microwave have been proposed as pre-treatments to increase the hydrolysis of complex material and solubilisation of organic matter [8,9]. Another effective way to increase biogas yields is the increase in the organic loading rate (OLR) by the addition of co-substrates with high methane potential.

The addition of an organic substrate with high biodegradability increases biogas production and thereby reduces the consumption of external energy needed for plant operation. The valorisation of biogas by the use of a combined heat and power unit provides a useful way to reduce the operating costs due to the production of electricity and the use of heat to maintain the temperature of the digester.

Several studies have been focused on the co-digestion of SS with different types of wastes [11-12]. Cheese whey (CW) has been proposed as a suitable substrate for valorisation under anaerobic digestion [13] and dark fermentation processes for hydrogen (H<sub>2</sub>) recovery [14]. However these alternatives have proven difficult of operating due to the need of nutrient or alkalinity addition in the first case [15] and problems, in the second case, associated to the microbial prevalence of non H<sub>2</sub> producers when operating under continuous conditions [16].

CW is a liquid effluent obtained from cheese factories during the process of precipitation and removal of milk casein. This waste stream presents a high content in easily biodegradable organic matter. This, makes it a suitable co-substrate when added to digestion systems treating manures [17, 18]. Recently, research interest has been focus in the co-digestion of CW and sewage sludge [19, 20]. However, the effect of the temperature over the digestion process is an important parameter when considering the addition of readily biodegradable substrates, due to the possible inhibitory effect caused by volatile fatty acid build-up.

The temperature of the digestion system is commonly set at 36 – 40 °C. However, WWTP managers are increasing digestion temperature as a way to increase digester productivity and therefore revenues. The thermophilic digestion of SS has been studied by several authors reporting an increase in biogas production [11, 21]. However, this increase in efficiency of the digestion was not always related to a higher volatile solid (VS) destruction [21]. In addition, Bayr and Rintala [11], in their study of co-digestion of SS with pulp and paper mill primary sludge, reported a small increase in biogas production when operating at thermophilic conditions. Similar results were obtained by Chi and co-workers [22] when digesting thickened WAS, and Nges and Liu [23] when digesting dewatered-sewage.

Based on the previous comments, the objective of this research was to assess the biogas potential of a suitable co-substrate, such as CW, in order to be co-digested with SS under mesophilic and thermophilic conditions. The novelty of the present work is to perform the digestion of this mixture under different temperature conditions and determine the effect of the increase in the temperature over methane yield and degradation rate.

## 8.2. MATERIALS AND METHODS

### 8.2.1. Substrate and inoculum

SS was obtained from the WWTP of Cáceres (Spain). The plant has an anaerobic digester for the treatment of SS. The digester is fed with a mixture of primary and secondary sludge and operates under mesophilic regimen. Its anaerobic digested sludge was used as inoculum.

CW was studied as suitable co-substrate for the digestion process based on the availability of this residue near the location of the WWTP. The area is characterised by the presence of several cheese factories. For this reason, different types of CW were collected from local cheese factories in the surrounding area. The chemical characteristics of the material used in this study are presented in Table 8.1.

**Table 8.1.** Characterisation of Substrates and Inoculum.

Parameters	Inoculum	SS	CW <sub>1</sub> <sup>a</sup>	CW <sub>2</sub> <sup>a</sup>	CW <sub>3</sub> <sup>a</sup>	CW <sub>4</sub> <sup>a</sup>
TS (g L <sup>-1</sup> )	12.3	19.0	106	74	70	67
VS (g L <sup>-1</sup> )	8.0	14.9	102	60	54	50
COD (g L <sup>-1</sup> )		-	143	99	95	91
Alkalinity (mg L <sup>-1</sup> )	1 316	512	1 000	588	656	7 460
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	276	137	19.6	18.7	24.5	7520
pH	7.2	6.3	4.7	4.5	4.6	5.7
Organic matter (%)	0.87	1.17	9.8	5.4	4.4	4.8
Kjeldahl Nitrogen (%)	0.1	0.1	0.33	0.17	0.17	0.79
C/N	4.7	6.6	17.2	18.0	15.2	3.5
Lipids (%)	-	-	0.27	0.07	<0.01	<0.01
Phosphorus (ppm)	30 920 <sup>b</sup>	24 530 <sup>b</sup>	594	445	484	398

<sup>a</sup>CW<sub>1</sub> crude whey, CW<sub>2</sub> crude whey, CW<sub>3</sub> from skimmed milk process, CW<sub>4</sub> from acidified milk process.

<sup>b</sup>Expressed in dry basis

### **8.2.2. Batch digestion experiments**

Batch experiments were performed to determine the biochemical methane potential of individual substrates and a mixture of CW and SS. For this purpose, batch reactors (Erlenmeyer flasks of 250 mL volume) were filled with inoculum and the corresponding amount of individual substrate or a mixture of two substrates, according to the desired ratio of VS inoculum:substrate (I:S). Tap water was added to complete 250 mL volume when needed. A batch experiment was also carried out in a reactor containing only inoculum, to determine the endogenous biogas production. All batches were performed in duplicate. Experiments were carried out until the cessation of gas production was observed. The temperature of digestion was set at 34 °C for mesophilic and 55 °C for thermophilic tests. The temperature was controlled by a water bath. Agitation was provided by means of magnetic stirrers.

The Erlenmeyer flasks were inoculated using a ratio of VS (I:S) in the range of 2.5:1-1:1. The ratio was selected based on the substrate in order to avoid the need of adding alkali solutions for pH control. Digestion systems were denoted in accordance with the substrate being digested, this is: SS, CW with this being preceded by the label of the temperature regimen. Co-digestion of sludge was evaluated for CW1 at 5% (v/v). This co-substrate was selected based on availability and proximity to the WWTP.

Digestion tests under thermophilic conditions when treating SS individually were performed using mesophilic inoculum obtained from the digester of the WWTP. Based on poor results obtained under thermophilic conditions, the thermophilic inoculum was adapted for a period of 3 months to be used as inoculum in the following set of thermophilic batch tests. The adaptation consisted in semi-continuous feeding of the system with SS during the 3 months period and kept at 55 °C. The OLR applied was 1 g VS L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> and systems were fed twice a week. Before using this inoculum in batch tests, the feeding was suspended for a 2 weeks period.

### **8.2.3. Kinetic analysis**

Methane produced was fitted to the modified Gompertz equation (1) according to Zwieterig et al. [24].

$$P_{(t)}=P_{\max} \cdot \exp \left[ -\exp \left[ \left( \frac{R_{\max}}{P_{\max}} \right)^e / P_{\max} \right] (\lambda - t) + 1 \right] \quad (1)$$

Where  $P(t)$  is the cumulative methane yield ( $L\ kg^{-1}\ VS$ ) at incubation time  $t$  (d);  $P_{\max}$  is the methane production potential ( $L\ kg^{-1}\ VS$ ),  $R_{\max}$  is the maximum methane production rate ( $L\ kg^{-1}\ VS\ d^{-1}$ ),  $\lambda$  is lag-phase time (d) and  $e$  is equal to 2.718. Data analysis was performed using Origin 6.1 software.

A modification to the model was proposed when an extended lag phase was observed. This modification considers the addition of a new parameter corresponding to the initial methane production obtained from the experiment.

$$P_{(t)}=P_{\text{init}} + P_{\max} \cdot \exp \left[ -\exp \left[ \left( \frac{R_{\max}}{P_{\max}} \right)^e / P_{\max} \right] (\lambda - t) + 1 \right] \quad (2)$$

#### **8.2.4. Analytical techniques**

Total solids (TS), VS, pH, ammonia and alkalinity were determined in accordance with APHA Standard Methods [25]. Chemical oxygen demand (COD) was determined using a Hanna Instruments Series C99 multi-parameter photometer. The homogenised sample was digested in the presence of dichromate at  $150\ ^\circ C$  for 2 h in a Hanna C9800 reactor. The production of biogas from reactors was measured using a reversible liquid displacement apparatus. Measurements were corrected to standard temperature and pressure (STP),  $0\ ^\circ C$  and 760 mmHg, respectively.

Nitrogen concentration was determined by the Kjeldahl method. Organic matter was analysed in accordance with the Walkley-Black method [26]. Lipid content was determined by Soxhlet extraction using Velp Scientifica SER 148/3 in accordance with the APHA Standard Methods [25]. The extract for determination of cations and phosphorus was obtained by wet digestion carried out with  $HNO_3$  65% in a pressurised microwave oven at  $170-200\ ^\circ C$  for 20 min. Total phosphorus in the extract was quantified by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) using Perkin Elmer Optima 2000 DV.

Biogas composition was analysed using a gas chromatograph (Varian CP 3800 GC) equipped with a thermal conductivity detector. Columns used were HayeSep Q

80/100 (4 m long) followed by a molecular sieve column (1 m). The carrier gas was helium and the columns were operated at a pressure of 331 kPa and a temperature of 50 °C. Volatile fatty acids (VFAs) were determined on the same gas chromatograph, using a flame ionization detector (FID) equipped with a Nukol capillary column (30m×0.25mm×0.25m) from Supelco. Injector and detector temperatures were 220 and 250 °C, respectively. The oven temperature was set at 150 °C for 3 min and thereafter increased to 180 °C. Samples were previously centrifuged (10 min, 3500×g) and the supernatant filtrated through 0.45 µm cellulose filters.

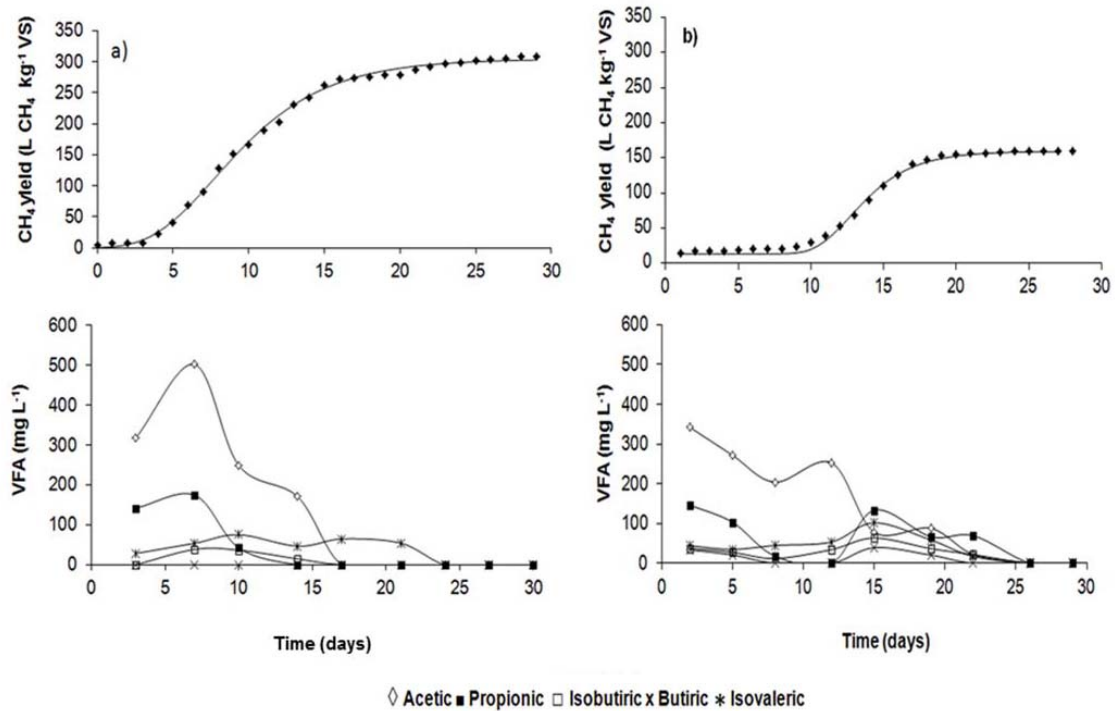
## 8.3. RESULTS AND DISCUSSION

### 8.3.1. *Batch experiments of SS*

Figure 8.1, presents the results obtained from batch digestion experiments of SS. The digestion of SS was initially performed under mesophilic condition at an I:S ratio of 1. However, the rapid acidification of SS prevented the further digestion of the substrate (data not reported). A second experiment was then performed, in this case with an I:S ratio of 2. Results are shown in Figure 8.1 a and indicate an initial accumulation of VFA that were degraded subsequently.

On the contrary, the thermophilic digestion process (Figure 8.1 b) was successfully carried out using an I:S ratio of 1. After the lag phase period had been overcome, the thermophilic system seemed to show a greater capacity to degrade the substrate at the I:S ratio initially set. The conversion of the organic material was achieved in a short time although the final value obtained for the specific methane production was much lower than that at mesophilic conditions. The thermophilic experiment was performed using mesophilic inoculum; thereby an extended lag phase was to be expected in this experiment. The poor result may probably be explained by the prolonged inhibitory state experienced by this reactor and by the fact that the experiment was performed using a non-adapted inoculum to thermophilic conditions. Furthermore, the VFA content in the thermophilic system was lower even though the organic load applied was higher, indicating that the system was not fully degrading the substrate. With regard to the destruction of VS, the mesophilic system achieved a value

of 29%, while the thermophilic reactor reported a value of only 6% which was in accordance to the poor performance of this fermentation system.



**Figure 8.1.** CH<sub>4</sub> yield and VFA concentration during batch digestion tests of SS under - (a) mesophilic - (b) thermophilic conditions.

The extended lag phase that was observed in the thermophilic test took place after having produced biogas on the first day of the experiment. This first gas sample was characterised by a high content of CO<sub>2</sub>. From that day onwards the volume of gas produced was small until the system was able to overcome this lag phase. Unlike the mesophilic system, whose gas production could be adjusted to the modified Gompertz model, the thermophilic system presented a sigmoid type gas production curve. These experimental data were adjusted to the modified Gompertz model by considering the initial volume of methane produced as an additional parameter according to equation 2. Parameters obtained from the model are presented in Table 8.2. The values of R<sub>max</sub> were similar for both digestion tests, in this sense the non-adapted thermophilic inoculum did not present a better performance than its mesophilic counterpart.



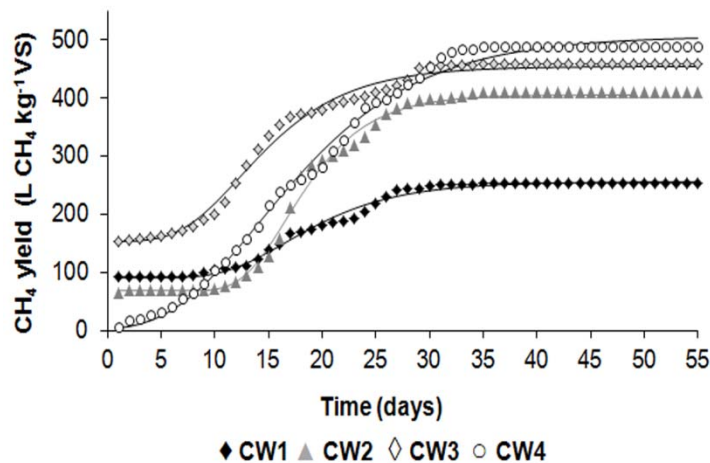
**Table 8.2.** Results and parameters estimated from batch digestion tests.

Samples	VS removal (%)	Estimated Pmax (L CH <sub>4</sub> kg <sup>-1</sup> VS)	Rmax (L CH <sub>4</sub> kg <sup>-1</sup> VS d <sup>-1</sup> )	λ (d)	R <sup>2</sup>
<b>M-SS</b>	29	304.4 ± 2.0	27.3 ± 2.6	3.7 ± 0.1	0.998
<b>T-SS</b>	6	160.6 ± 1.9 P_init <sup>a</sup> 17.6 ± 0.9	21.2 ± 0.9	10.4 ± 0.1	0.998
<b>M-CW<sub>1</sub></b>	46.7	274.2 ± 7.9 P_init <sup>a</sup> 96.1 ± 2.4	10.1 ± 1.0	11.8 ± 0.4	0.989
<b>M-CW<sub>2</sub></b>	55.3	405.5 ± 7.6 P_init <sup>a</sup> 68.4 ± 3.5	29.8 ± 2.0	12.5 ± 0.2	0.994
<b>M-CW<sub>3</sub></b>	43.5	454.4 ± 11.9 P_init <sup>a</sup> 152.9 ± 6.3	20.1 ± 1.8	6.8 ± 0.4	0.989
<b>M-CW<sub>4</sub></b>	48.7	506.7 ± 3.7	22.4 ± 2.3	5.9 ± 0.2	0.997
<b>MSS-CW<sub>1</sub></b>	30.0	301.2 ± 4.7 P_init <sup>a</sup> 27.9 ± 3.0	25.8 ± 1.1	6.7 ± 0.1	0.996
<b>TSS-CW<sub>1</sub></b>	23.4	250.6 ± 12.1	25.8 ± 13.5	5.4 ± 0.4	0.974

<sup>a</sup>P\_init Estimated production of methane obtained at the beginning of the test calculated from the modified Gompertz model.

### 8.3.2. Batch experiments of CW

Results obtained from batch digestion tests under mesophilic regimen for the different CWs tested are presented in Figure 8.2 and Table 8.2. The digestion tests were performed with a ratio I:S of 2.5:1 in order to avoid inhibitory conditions due to pH drops. The shape of the cumulative curves obtained for the different CWs tested followed a similar pattern, with an initial production of gas on the first day of the experiment and then followed by an extended lag phase which is finally overcome by microorganisms. The exception being CW4, obtained from an enzymatic acidification process of milk. The higher alkalinity and ammonium content of this substrate may have aided in buffering the liquid phase, thus resulting in a biogas curve presenting a continuous production with almost a linear shape.



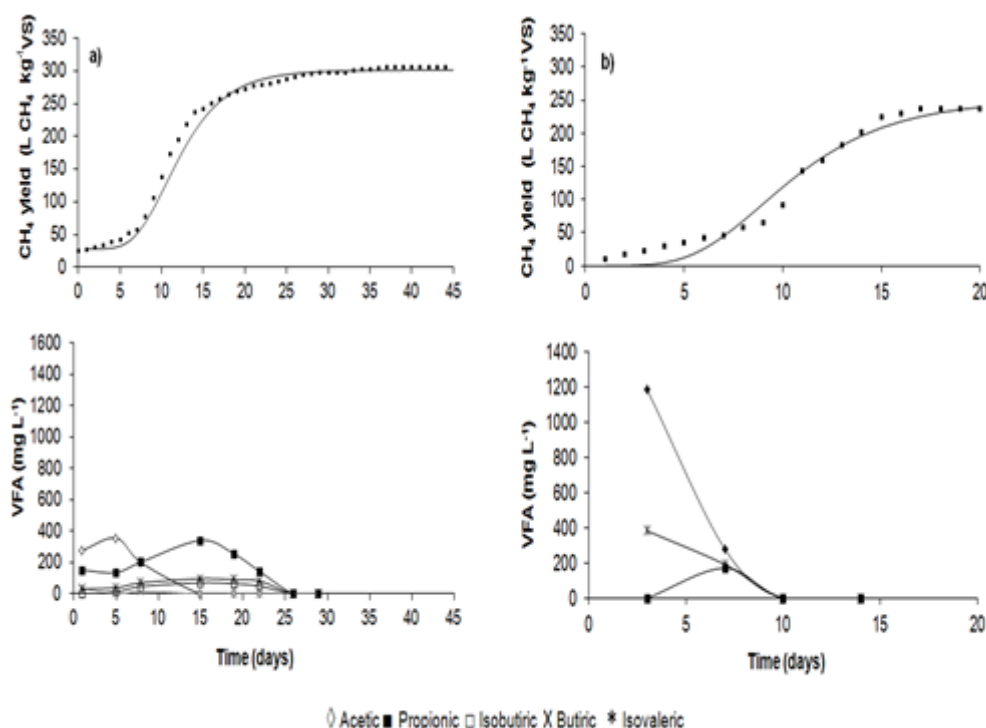
**Figure 8.2.**  $CH_4$  yield of the different substrates studied during batch digestion tests.

CW is a substrate characterised by being easily degraded by microorganisms. This substrate is rapidly acidified, producing the accumulation of VFA and drops in pH of the fermentation systems. Other problems associated with direct anaerobic treatment of whey include instability of the reactor, difficulty to obtain granulation, and reduced sludge settling due to the tendency to produce an excess of viscous exopolymeric materials, probably of bacterial origin [27]. Digestion results presented in Figure 8.2 showed that the mesophilic digestion of CW even though being successfully attained presents several difficulties which become evident during the first ten days of the process. However, different authors have extensively studied the use of CW as co-substrate [17, 28, 29] since the easily degraded organic material can balance the C/N ratio and hence results in significant increases in biogas yields.

### 8.3.3. Batch experiments of co-digestion

Considering the successful results reported by different authors, additional batch digestion tests were performed for evaluating the co-digestion of SS with CW1. Results from mesophilic co-digestion tests are presented in Figure 8.3 a.  $CH_4$  yield remained about the same of that obtained from the mesophilic digestion of sludge. This indicates that the benefits of co-digestion when adding this co-substrate would be associated to the increase attained in OLR and thus in the effective use of the volume of reactor, rather than to an increase in the specific methane production. During the initial stage of

digestion, an accumulation of VFA was observed which was associated to the lag phase observed in cumulative gas curves.



**Figure 8.3.** CH<sub>4</sub> yield and VFA concentration during batch co-digestion tests of SS and CW under - (a) mesophilic - (b) thermophilic conditions.

Figure 8.3 b presents results obtained from co-digestion tests of this substrate under thermophilic conditions. In this case, the results from co-digestion with CW1 demonstrated a high acidification at the initial stage which was responsible for the low rate of gas production obtained during the first eight days of the experiment. Biogas production increased when a significant reduction in VFAs was attained. Methane yield obtained was 248 ml CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> VS. This value was much lower than the one obtained under mesophilic conditions. This behaviour may be explained by the higher values of VFAs measured under thermophilic regimen which may have partially inhibited methanogenic activity, thus resulting in a poor performance of the digestion system. However, values of R<sub>max</sub> were similar under both regimens of temperature.

## 8.4. CONCLUSIONS

Thermophilic and mesophilic digestion of SS was attained under batch digestion tests. The process was characterised by similar degradation rate compare to its mesophilic counterpart. On the other hand, methane yields obtained were higher for mesophilic systems. Results related to co-digestion tests, indicated that under thermophilic conditions methane yield was also lower. Maximum VFAs concentration measured in this system may have favoured a partial inhibition of methanogenic bacteria. However,  $R_{\max}$  values were similar under both temperature conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was possible thanks to the financial support of the Spanish Ministry of Science and Innovation through FEDER funds IPT-2011-1519-310000.

## 8.5. REFERENCES

- [1] Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., Dewil, R., 2008, Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge, *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 755-781.
- [2] Wang, Z., Wang, W., Zhang, X., Zhang, G.. 2009, Digestion of thermally hydrolyzed sewage sludge by anaerobic sequencing batch reactor, *J Hazard Mater.*,162, 799-803.
- [3] Niu, D., Huang, H., Dai, X., Zhao, Y., 2013, Greenhouse gases emissions accounting for typical sewage sludge digestion with energy utilization and residue land application in China, *Waste Manage.*, 33, 123-128.
- [4] Sablayrolles, C., Gabrielle, B., Montrejaud-Vignoles, M. 2010, Life Cycle Assessment of Biosolids Land Application and Evaluation of the Factors Impacting Human Toxicity through Plant Uptake, *J. Ind. Ecol.*, 14, 231-241.

- [5] Martínez, E.J., Redondas, V., Fierro, J., Gómez, X., Morán, A., 2011, Anaerobic digestion of high lipid content wastes: FOG co-digestion and milk processing FAT digestion, *J. Residuals Sci. Technol.*, 8, 53-60.
- [6] Kim, J., Park, C., Kim, T.H, Lee, M., Kim, S., Kim, S.W., Lee, J., 2003, Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge, *J. Biosci. Bioeng.*, 95, 271-275.
- [7] Luo, K., Yang, Q., Li, X.M., Yang, G.J., Liu, Y., Wang, D.B., Zheng, W., Zeng, G.M., 2012, Hydrolysis kinetics in anaerobic digestion of waste activated sludge enhanced by  $\alpha$ -amylase, *Biochem. Eng. J.*, 62, 17-21.
- [8] Coelho, N.M.G., Droste, R.L., Kennedy, K.J., 2011, Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge, *Water Res.*, 45, 2822-2834.
- [9] Beszédes, S., László, Z., Horváth, Z.H., Szabó, G., Hodúr, C., 2011, Comparison of the effects of microwave irradiation with different intensities on the biodegradability of sludge from the dairy and meat-industry, *Bioresour. Technol.*, 102, 814-821.
- [10] Athanasoulia, E., Melidis, P., Aivasidis, A., 2014, Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production, *Renewable Energy*, 62, 73-78.
- [11] Bayr, S., and Rintala, J., 2012, Thermophilic anaerobic digestion of pulp and paper mill primary sludge and co-digestion of primary and secondary sludge, *Water Res.*, 46, 4713-4720.
- [12] Martínez, E.J., Fierro, J., Sánchez, M.E., Gómez, X., 2012, Anaerobic co-digestion of FOG and sewage sludge: Study of the process by Fourier transform infrared spectroscopy, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 75, 1-6.
- [13] Diamantis, V.I., Kapagiannidis, A.G., Ntougias, S., Tataki, V., Melidis, P., Aivasidis, A., 2014, Two-stage CSTR-UASB digestion enables superior and alkali addition-free cheese whey treatment. *Biochem. Eng. J.*, 84, 45-52

- [14] Kisiielewska, M., Wysocka, I., Rynkiewicz, M.R., 2013, Continuous biohydrogen and biomethane production from whey permeate in a two-stage fermentation process. *Environ. Prog. Sust. Energ.*, doi: 10.1002/ep.11890
- [15] Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., Cheese whey management: A review, 2012, *J. Environ. Manage.*, Volume 110, 48-68.
- [16] Fernández, C., Carracedo, B., Martínez, E.J., Gómez, X., Morán, A., 2014, Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: Effect of organic loading rate. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 49, 210-217
- [17] Kavacik, B., and Topaloglu, B., 2010, Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure, *Biomass Bioenergy*, 34, 1321-1329.
- [18] Bertin, L., Grilli, S., Spagni, A., Fava, F., 2013, Innovative two-stage anaerobic process for effective codigestion of cheese whey and cattle manure. *Bioresour. Technol.*, 128, 779-783.
- [19] Shilton, A., Powell, N., Broughton, A., Pratt, C., Pratt, S., Pepper, C., 2013, Enhanced biogas production using cow manure to stabilize co-digestion of whey and primary sludge. *Environ. Technol.*, 34, 2491-2496.
- [20] Powell, N., Broughton, A., Pratt, C., Shilton, A., 2013, Effect of whey storage on biogas produced by co-digestion of sewage sludge and whey. *Environ. Technol.*, 34, 2743-2748.
- [21] Song, Y.C., Kwon, S.J., Woo, J.H., 2004, Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water Res.*, 38, 1653-1662.
- [22] Chi, Y., Li, Y., Fei, X., Wang, S., Yuan, H., 2011, Enhancement of thermophilic anaerobic digestion of thickened waste activated sludge by combined microwave and alkaline pretreatment, *J. Environ. Sci.*, 23, 1257-1265.

- [23] Nges, I.A., and Liu, J., 2010, Effects of solid retention time on anaerobic digestion of dewatered-sewage sludge in mesophilic and thermophilic conditions, *Renew. Energy*, 35, 2200-2206.
- [24] Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990, Modeling of the bacterial growth curve, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1875-1881.
- [25] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., Washington, D.C., USA: American Public Health Association, 1998.
- [26] Walkley, A., Black, I.A., 1934, An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method, *Soil Science*, 37, 29-38.
- [27] Malaspina, F., Stante, L., Cellamare, C.M., Tilche, A., 1995, Cheese whey and cheese factory wastewater treatment with a biological anaerobic—aerobic process, *Water Science and Technology*, 32, 59-72.
- [28] Comino, E., Riggio, V.A., Rosso, M., 2012, Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey, *Bioresour. Technol.*, 114, 46-53.
- [29] Dareioti, M.A., Dokianakis, S.N., Stamatelatou, K., Zafiri, C., Kornaros, M., 2009, Biogas production from anaerobic co-digestion of agroindustrial wastewaters under mesophilic conditions in a two-stage process, *Desalination*, 248, 891-906





## *Capítulo 9*

# *Conclusiones generales*



## CONCLUSIONES

### **Respecto a los ensayos en discontinuo**

- Durante las pruebas en discontinuo, el aumento de la carga orgánica inicial provocó la acumulación de ácidos grasos volátiles, principalmente ácido acético y propiónico, originando problemas de inhibición.
- El rendimiento de producción de CH<sub>4</sub> más alto fue de 417,9 L CH<sub>4</sub>/kg DQO, para una concentración inicial de 6,2 g SV/L.

### **Respecto a los ensayos en semi-continuo en régimen mesofílico**

- Mediante la aplicación de un reactor secuencial (SBR), se consiguió operar de forma estable, aunque se observó un descenso de la producción específica de metano y la conversión de materia orgánica al reducir el tiempo de retención hidráulica (TRH). Fue posible reducir el TRH hasta 13,9 días, con un rendimiento de producción de 305,4 L CH<sub>4</sub>/kg DQO. El funcionamiento de este sistema se puede mejorar mediante la incorporación de una unidad de membrana de microfiltración que permite tratar el efluente para facilitar su tratamiento, con resultados de reducción del contenido orgánico entre un 88,6-95,2%.

### **Respecto a las pruebas con membranas cerámicas de microfiltración**

- Durante las pruebas realizadas con ácidos húmicos, se comprobó que estos compuestos son responsables de problemas de ensuciamiento en las membranas, tras depositarse en su superficie provocan un descenso del flujo de permeado. El problema se incrementa con la presencia de sales y metales pesados. Al aumentar la presión transmembrana la retención de ácidos húmicos disminuye, mientras que un aumento del caudal favoreció mayores retenciones.

### **Respecto a la digestión anaerobia termofílica**

- El aumento de la temperatura del digestor para operar en régimen termofílico permitió reducir el TRH hasta 8,3 días, permitiendo obtener una producción específica de 314,5 L CH<sub>4</sub>/kg DQO.

### **Respecto a las pruebas de fermentación oscura**

- Aplicando un reactor de lecho empacado con espuma de poliuretano se detectó un descenso del rendimiento de producción de hidrógeno, 0,459 a 0,335 mol H<sub>2</sub>/mol lactosa, al reducir la carga orgánica de 12,5 a 6.3 g DQO/L d. En el análisis microbiológico realizado a muestras del reactor se detectó la presencia de bacterias no productoras de hidrógeno, *Sporolactobacillus sp* y *Prevotella*, que perjudicaron el rendimiento. En este tipo de sistemas se hace necesario plantear la aplicación de pretratamientos en el sustrato para reducir su aparición.

### **Respecto a la digestión anaerobia en dos etapas**

- En el reactor de fermentación oscura se observó un aumento de la producción volumétrica de hidrógeno, 0,15–0,18 L H<sub>2</sub>/L d, al reducir el TRH, aunque este aumento no se correspondió con el aumento de la carga orgánica, perjudicando el rendimiento de producción de hidrógeno, 12,0-7,3 L H<sub>2</sub>/kg DQO.
- Durante la digestión anaerobia del efluente de fermentación oscura, con un TRH de 25 días se obtuvo una mejoría en la producción específica (349,5 L CH<sub>4</sub>/kg DQO) en comparación con el sistema de digestión de una etapa (312,4 L CH<sub>4</sub>/kg DQO) sin embargo, al reducir el TRH se apreció un descenso de este parámetro. Con un TRH de 12,5 días se detectaron problemas de funcionamiento, posiblemente asociados a un aumento del contenido en sales de sodio y potasio en el reactor. Estos compuestos fueron añadidos durante el control del pH en el reactor de producción de H<sub>2</sub>.

**Respecto al estudio de las estructuras orgánicas de los digeridos mediante FTIR y <sup>1</sup>HNMR**

- En los resultados de los espectros FTIR al reducir el TRH del digestor en dos etapas se observó un aumento de los picos de la región de los compuestos insaturados y de los polisacáridos. En el espectro <sup>1</sup>HNMR se apreció un aumento del contenido en compuestos lipídicos, provocado por un posible crecimiento en el sistema de poblaciones bacterianas con una pared celular rica en grupos de triglicéridos en respuesta a un entorno con mayor salinidad. No obstante, estos microorganismos presentaron una menor capacidad de degradación del sustrato.

**Respecto a las pruebas de co-digestión con lodos de estación depuradora de aguas residuales**

- La digestión individual de un lodo de depuradora y su co-digestión con lactosuero 5% (v/v) se evaluó en condiciones de régimen mesofílico y termofílico. Durante las pruebas de co-digestión en régimen mesofílico se obtuvieron rendimientos de producción más altos (301,2 L CH<sub>4</sub>/kg SV) que en régimen termofílico (250,6 L CH<sub>4</sub>/kg SV). Las pruebas termofílicas presentaron una mayor acumulación de ácidos grasos volátiles que pudo originar problemas de inhibición y reducir el rendimiento.

## CONCLUSIONS

### Regarding batch experiments

- The increase in substrate concentration resulted in inhibitory periods due to the accumulation of volatile fatty acids, mainly acetic and propionic.
- The highest methane yield attained was 417.9 L CH<sub>4</sub>/kg COD, with an initial concentration of cheese whey of 6.2 g VS/L.

### Regarding semi-continuous experiments at mesophilic regime

- The application of a sequencing batch reactor (SBR) was proposed to favour accumulation of biomass inside the reactor. However, it was observed a decrease in methane yield and organic matter conversion as HRT was reduced. The operation was feasible at an HRT of 13.9 days; with a methane yield of 305.4 L CH<sub>4</sub>/ kg COD. The operation of this reactor may be improved by the application of a membrane unit to treat the effluent allowing a recovery of 88.6-95.2 % of organic matter,

### Regarding tubular microfiltration ceramic membranes tests

- Deposition of humic acid particles took place and presented a significant effect over the fouling behaviour of the membrane unit, with a decrease in permeate flux. In addition, humic acid retention increased considerably with salinity and the presence of heavy metals. Application of higher transmembrane pressure favoured smaller humic acid retentions, while higher flow rate resulted in higher humic acid retentions.

### **Regarding thermophilic anaerobic digestion**

- The increase of reactor temperature to thermophilic regimen allowed a reduction in HRT to 8.3 days, with a specific methane production of 314.5 L CH<sub>4</sub> kg/ COD.

### **Regarding dark fermentation tests**

- The production of H<sub>2</sub> was studied using a packed bed reactor with polyurethane foam acting as support material. A significant decrease in H<sub>2</sub> yields, 0.459 to 0.335 mol H<sub>2</sub>/mol lactose, was observed with the decrease in OLR from 12.5 to 6.3 g COD/L d. Microbial analysis demonstrated that the presence of non-hydrogen producers, *Sporolactobacillus sp* and *Prevotella*, was associated with low H<sub>2</sub> yields obtained. It will be necessary the application of pre-treatments to the substrate to avoid the presence of these microorganisms.

### **Regarding two-stages anaerobic digestion**

- An increase in daily volumetric hydrogen production was observed with the decrease in HRT, 0.15–0.18 L H<sub>2</sub>/L reactor d, although this was not directly linked to the higher organic loading rate applied. As a result, the specific hydrogen production was negatively affected 12.0-7.3 L H<sub>2</sub>/kg COD.
- Digestion of the hydrogen reactor effluent at an HRT of 25 days, resulted in an improvement of methane yield (349.5 L CH<sub>4</sub>/kg COD) comparing with one stage digestion (312.4 L CH<sub>4</sub>/kg COD) at similar HRT. However, as HRT was further reduced, performance was deteriorated at an HRT of 12.5 days, operating problems were observed, probably associated to an increase in sodium and potassium content due to the addition of alkalinity in the H<sub>2</sub> producing phase.

**Regarding organic matter structure results of  $^1\text{H}$ NMR and FTIR spectra analysis**

- FTIR spectra obtained from the digestion stage, at an HRT of 12.5 days, revealed an increase of unsaturated and polysaccharide compounds. The  $^1\text{H}$ NMR spectra, presented higher content in lipid structures. Dominant methanogens were probably characterised by a lipid core structure rich in triacylglycerol groups as a response to higher salinity environment. However, these microorganisms presented lower capacity for degrading the substrate.

**Regarding anaerobic co-digestion of cheese whey with sewage sludge**

- Thermophilic and mesophilic digestion of sewage sludge and cheese whey (5% (v/v)) was attained under batch tests. Results from co-digestion tests, indicated that under thermophilic conditions methane yield was lower, (250.6 L  $\text{CH}_4/\text{kg}$  VS), than that under mesophilic, (301.2 L  $\text{CH}_4/\text{kg}$  VS). High volatile fatty acids concentration in thermophilic systems may have caused a partial inhibition of methanogenic bacteria.