



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Modelización de la dinámica de los microorganismos anaerobios sintróficos oxidantes del ácido acético (SAO)

Treball final de grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Albert Moreno Mingorance

Tutor: Xavier Flotats Ripoll

10/ juliol / 2014

“El razonamiento matemático puede considerarse más bien esquemáticamente como el ejercicio de una combinación de dos instalaciones, que podemos llamar la intuición y el ingenio”.

Alan Turing

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización de este trabajo final de grado. Entre ellas, al tutor del trabajo, D. Xavier Flotats por la ayuda y apoyo prestado y por todo lo que he aprendido durante la realización del trabajo, que espero que me sea útil en el resto de mi aprendizaje y vida laboral.

También agradecer a mi familia por apoyarme y animarme en los momentos de mayor estrés. A ellos está dedicado este trabajo.

Resumen

En la digestión anaerobia una de las etapas más sensibles es la metanogénesis. Los principales organismos productores de metano, las arqueas metanogénicas acetoclásticas, que degradan el ácido acético a metano, son muy sensibles a concentraciones elevadas de amoníaco, lo que conlleva problemas en el proceso.

Para intentar solucionar este inconveniente y comprender mejor el proceso, recientemente se están estudiando más a fondo las bacterias SAO. Estas también poseen la capacidad de degradar el acético y son menos sensibles al amoníaco. A diferencia de las acetoclásticas, SAO transforma el acetato en hidrógeno y dióxido de carbono. El H_2 producido es transformado en metano por arqueas metanogénicas hidrogenófilas. Además, SAO son muy sensibles a la presión parcial de hidrógeno, por lo que es imprescindible para su desarrollo el consumo de H_2 por parte de las metanogénicas hidrogenófilas.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio de las bacterias SAO, con el fin de poder implementar su dinámica en el modelo ADM1. Una vez implementada, se procedió a la identificación de parámetros utilizando datos experimentales de ensayos discontinuos simultáneos, con diferentes concentraciones iniciales de amonio, acetato e hidrógeno, utilizando un inóculo procedente de una planta de biogás cuyo comportamiento sugería la posible presencia de SAO.

Por otra parte, como los organismos SAO son muy sensibles a la termodinámica de la reacción, se estudió el modelo adoptando estequiometría variable y se comparó con el modelo ADM1. Este último, según los resultados, podría no cumplir el segundo principio de la termodinámica, produciendo reacciones endergónicas.

Los resultados obtenidos indican el interés en modificar el modelo de referencia ADM1 para que contemple la presencia de microorganismos SAO. Los ajustes a los datos experimentales, realizados mediante el modelo ADM1 modificado, corroboran la presencia de una concentración inicial apreciable de SAO en las muestras estudiadas, con concentraciones superiores a las de arqueas metanogénicas acetoclásticas.

Abstract

In the anaerobic digestion process, the most sensitive step is the methanogenesis. The main methane producing organisms are the acetoclastic methanogenic archaea that degrade the acetic acid to methane. These microorganisms are very sensitive to high concentrations of ammonia, which leads to operation problems. Recently, it has been studied a microorganism that also has the ability to degrade acetate, SAO bacteria, less sensitive to ammonia and favoring the methane production through the hydrogenotrophic methanogens.

In the present project, a study of the SAO bacteria was made, in order to add them in the ADM1 model. These microorganisms are able to oxidize acetic anaerobically to hydrogen and carbon dioxide. The reaction is very sensitive to the partial pressure of H_2 , needing the presence of hydrogenotrophic methanogenic archaea, which consume the H_2 generated and transform to methane. Once the population SAO was implemented in the model, the kinetic parameters of these new bacteria were identified by using experimental data and optimizing the sum of the square of differences between these data and values predicted by the model. The experimental data came from simultaneous batch test with different initial concentrations of ammonium, acetate and hydrogen, using an inoculum from a biogas plant whose behavior suggested the possible presence of SAO.

Moreover, the variable stoichiometry model was studied because the SAO organisms are very sensitive to the reaction thermodynamics. That model was compared with the ADM1 model, which in the results seems that could not fulfill the second law of thermodynamics, simulating reactions which are endergonic in the reality.

The results indicate the interest of modifying the ADM1 model to consider the presence of the SAO microorganisms. The fitting to the experimental data, using the modified ADM1 model, corroborate the presence of an appreciable initial concentration of SAO in the samples, with higher concentrations than those of acetoclastic methanogenic archaea.

Índice

Agradecimientos	2
Resumen.....	3
Abstract	3
Índice de figuras	7
Índice de tablas	9
1. Introducción	10
1.1. Digestión anaerobia	10
1.1.1 Fase metanogénica.....	11
1.1.2 Inhibición por amonio	12
1.1.3 Oxidación Sintrófica de Acetato (SAO).....	13
1.2. Modelización	17
1.2.1. Modelos de digestión anaerobia.....	17
1.2.2. Anaerobic Digestion Model No. 1. (ADM1).....	17
1.2.3. Estequiometría variable	19
1.3. Estimación de parámetros	20
1.3.1. Métodos locales	20
1.3.1.1. Optimización simple sin restricciones.....	21
1.3.1.2. Optimización no lineal restringida: programación cuadrática secuencial	21
1.3.1.3. Múltiple disparo.	21
1.3.1.4. Método de búsqueda directa.....	22
1.3.2. Métodos Globales	22
2. Objetivos	23
3. Material y métodos	24
3.1. Incorporación de bacterias SAO en el modelo ADM1.....	24
3.2 Estequiometría variable	28
3.3 Comparación ADM1 con estequiometría variable	31
3.4 Obtención de datos experimentales.....	32
3.5 Algoritmo aplicado para la optimización de parámetros.....	32
3.6 Ajuste datos ADM1 con estequiometría variable	33
4 Resultados y Discusión	36
4.1 Comparación ADM1 y estequiometria variable (EV)	36

4.1.1	PNdifT	36
4.1.1	PH ₂ difT	37
4.2	Diferencia entre régimen termofílico y mesofílico en EV	38
4.3	Ajuste datos ADM1 a estequiometría variable	39
4.4	Optimización de datos experimentales.....	40
5	Conclusiones.....	47
6	Bibliografía	48
Anexos.....		51
1.	Algoritmo de optimización utilizado.	51
2.	Algoritmo que realiza las derivadas en estequiometría variable.....	53
3.	Datos Experimentales utilizados	58

Índice de figuras

Fig. 1-1. Fases de la fermentación anaerobia (Flotats y Campos, 2005).	10
Fig. 1-2. Fotografía tomada con microscopio electrónico de un co-cultivo de <i>T.phaeum</i> y <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> . A la izquierda se puede observar una célula joven con flagelo y a la derecha células adultas sin flagelo formando agregados (Oehler1 et al., 2012).	14
Fig. 1-3. Cambios calculados de energía libre de Gibbs de la oxidación de acetato (A) y la formación de metano (B) a varias presiones parciales de hidrógeno en condiciones aplicadas en el cocultivo (Schnuërer et al., 1997)	14
Fig. 1-4. Ruta de Wood/Ljungdahl (Hattori, 2008)	15
Fig. 1-5. Esquema de la transmisión de electrones entre Clostridium y arqueas metanogénicas a través del hierro (Jiang, S. et al., 2013.)	16
Fig. 1-6. Abundancia de SAO en 13 digestores de biogás a gran escala, expresado como el número de copias del gen diana de ARNr 16S en escala logarítmica. S1, <i>C. ultunense</i> ; S2, <i>S. schinkii</i> ; S3, <i>T. acetatoxydans</i> ; S4, <i>T. phaeum</i> ; TB, el total de bacterias (Sun et al., 2013).	16
Fig. 3-1. Diagrama de flujo del algoritmo de optimización	34
Fig. 4-1. Gráficos comparación ADM1 y EV. De la "A" a la "D" simulación ADM1, de la "E" a la "H" simulación con estequiometría variable. Diferentes curvas con distintas concentraciones de nitrógeno inorgánico inicial (0,1; 0,3; 0,5 mol N/L)	36
Fig. 4-2. Gráficos comparación ADM1 y EV. De la "A" a la "C" simulación ADM1, de la "D" a la "F" simulación con estequiometría variable. Diferentes curvas con distintas concentraciones iniciales de organismos hidrogenotrofos (Xh2)(0,1; 0,5; 1; 2 gDQO/L)	38
Fig. 4-3. Gráficos de EV en régimen mesofílico. Diferentes curvas con distintas concentraciones iniciales de organismos hidrogenotrofos (Xh2)(0,1; 0,5; 1; 2 gDQO/L)	39
Fig. 4-4. Representación del ajuste de estequiometría variable a los datos obtenidos con ADM1.	39
Fig. 4-5. Ajuste del modelo modificado de ADM1 a los datos experimentales de acetato. Cada uno corresponde al experimento que pone en su número.	41

Fig. 4-6. Ajuste del modelo modificado de ADM1 a los datos experimentales de metano. Cada uno corresponde al experimento que pone en su número. _____ 42

Fig. 4-7. Ajuste del modelo modificado de ADM1 a los datos experimentales de hidrógeno. Cada uno corresponde al experimento que pone en su número. _____ 43

Fig. 4-8. Ajuste del modelo ADM1 a los datos experimentales de acetato del experimento 2, con el dato repetición 2, tiempo 5,8 eliminado. _____ 44

Fig. 4-9. Ajuste del modelo ADM1 a los datos experimentales de metano del experimento 4 y 7 con los dos ultimo datos de cada repetición eliminados. _____ 44

Fig. 4-10. Simulación de la evolución de las poblaciones SAO y acetoclástica en los diferentes experimentos. _____ 46

Índice de tablas

Tabla 1-1. Reacciones metanogénicas (Zinder, 1993).	11
Tabla 1-2. Parámetros cinéticos de algunas bacterias SAO (Hattori, 2008).	15
Tabla 1-3. Ejemplo de matriz de Petersen.	18
Tabla 3-1. Procesos considerados	24
Tabla 3-2. Variables consideradas	24
Tabla 3-3. Parámetros estequiométricos	25
Tabla 3-4. Parámetros cinéticos	25
Tabla 3-5. Matriz de Petersen utilizada en ADM1 del componente 1 al 13.	26
Tabla 3-6. Matriz de Petersen ADM1 del componente 14 al 25 más el vector de velocidades de reacción.	27
Taula 3-7. Concentraciones iniciales (PNdifT)	31
Taula 3-8. Concentraciones iniciales (PH2difT)	32
Tabla 3-9. Alimentaciones por vial	32
Tabla 3-10. Intervalo de las variables a optimizar.	33
Tabla 4-1. Parámetros obtenidos y valor de R^2	39
Tabla 4-2. Valores de las incógnitas.	40

1. Introducción

1.1. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico donde un substrato orgánico, normalmente un residuo, es transformado principalmente en metano, dióxido de carbono e hidrógeno por microorganismos en condiciones de anaerobiosis. Estos a diferencia de los microorganismos aerobios, utilizan poca energía de la que tienen disponible, tienen una baja velocidad de crecimiento y utilizan poco material orgánico para construir su masa celular. El biogás (60-70% metano) que producen tiene un alto poder calorífico y se considera como una fuente de energía renovable. Actualmente en su mayoría se produce por la digestión de los lodos de depuración de aguas residuales, con contribuciones menores de fermentación o gasificación de residuos sólidos o de material lignocelulósico (Appels *et al.*, 2008 ; Flotats, 2014).

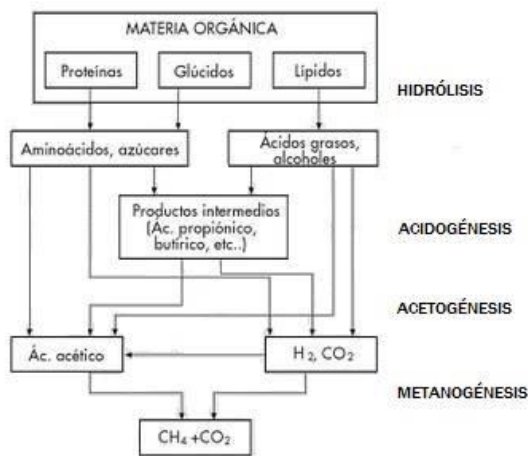


Fig. 1-1. Fases de la fermentación anaerobia (Flotats y Campos, 2005).

El proceso se puede dividir en varias etapas encadenadas en las que intervienen diferentes poblaciones de microorganismos, las cuales se pueden ver en la Fig. 1-1. En primer lugar se produce la hidrólisis. Esta consiste en procesos biológicos extracelulares y no biológicos que transforman tanto material orgánico insoluble como compuestos de alto peso molecular tales como lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleídos, en sustancias orgánicas solubles. La siguiente etapa es la acidogénesis en la cual bacterias

acidogénicas producen ácidos grasos volátiles (principalmente acetato, butirato, propionato, valerato, etanol y lactato) a partir de los monómeros solubles como glucosa, aminoácidos, entre otros, producidos en la hidrólisis o ya existentes en el substrato.

La tercera etapa es la acetogénesis. En esta etapa los ácidos orgánicos y alcoholes producidos anteriormente son digeridos por bacterias acetogénicas produciendo principalmente ácido acético, CO_2 y H_2 . El H_2 es utilizado como aceptador de electrones en esta fase y por esa razón esta conversión se controla en gran medida por la su presión parcial en la mezcla, ya que dependiendo de esta puede no ser viable termodinámicamente la reacción.

Por último, ocurre la metanogénesis, en la cual se produce metano mediante dos vías distintas. Una vía es la metalogénesis acetoclástica que utiliza principalmente el acetato como substrato produciendo metano y CO_2 . La otra vía es producida por las arqueobacterias hidrogenotróficas que reducen el CO_2 y oxidan el H_2 (Appels *et al.*, 2008).

Cada población de bacterias tienen diferentes velocidades de crecimiento y sensibilidad al ser inhibidos por compuestos intermedios como H_2 , amoniaco, ácido acético, etc. Según la composición del substrato y la operación del sistema, las poblaciones de microorganismos

variarán en cada etapa y por lo tanto sus velocidades; de manera que debe establecerse un equilibrio, frágil o estable, que evite la acumulación de compuestos intermedios que puedan ralentizar o parar el sistema ya que la velocidad global del proceso viene limitada por la etapa más lenta (Flotats, 2014).

1.1.1 Fase metanogénica

Las arqueas metanogénicas son responsables como ya se ha comentado anteriormente de la formación del metano, por ello son consideradas como una de las más importantes dentro del consorcio de microorganismos que actúan en la digestión anaerobia. Los organismos metanogénicos se clasifican en el dominio *Archaea*. A estas se les distingue de las bacterias verdaderas porque poseen características propias, como la formación de la membrana celular con lípidos isoprenoides y su unión mediante enlaces éter al glicerol, enlace más resistente que el éster que presentan las bacterias. Otra característica es que aunque presentan pared celular, esta no presenta peptidoglicano (Zinder, 1993). En cuanto a la morfología presentan gran variedad de formas como bacilos cortos y largos, células en forma de placas y metanógenos filamentosos, existiendo tanto Gram positivos como Gram negativos. Como se ha comentado también anteriormente, estos microorganismos se pueden dividir en dos grupos principales, las bacterias hidrogenotróficas que consumen hidrógeno y formiato como donador de electrones y reducen a metano el CO_2 o el bicarbonato, y los metilótrofos y acetoclásticos que consumen principalmente acetato. En esta reacción se oxida el grupo carboxilo y reduce el grupo metilo a metano. Además también pueden consumir metanol y algunas aminas, como se pueden observar en la Tabla 1-1, junto con la energía libre de Gibbs en condiciones estándar (ΔG°) que se libera de las reacciones (Zinder, 1993; Campos, 2001).

Tabla 1-1. Reacciones metanogénicas (Zinder, 1993).

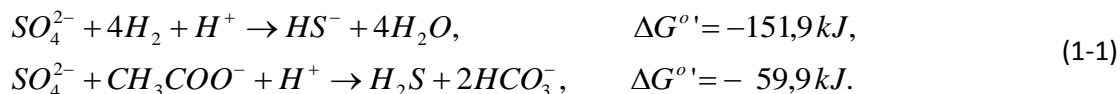
Reacción	ΔG° (kJ/mol CH_4)	Organismos
$\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135	Mayoría metanogénicos
$\text{H}_2\text{O} + 4\text{HCOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{HCO}_3^-$	-145	Muchos hidrogenótrofos
$5\text{H}_2\text{O} + 4\text{CO} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+$	-196	<i>Methanobacterium</i> y <i>Methanosarcina</i>
$2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-116	Algunos hidrogenótrofos ^a
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31	<i>Methanosarcina</i> y <i>Methanotrrix</i>
$\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^-$	-105	<i>Methanosarcina</i> y otros metilótrofos
$4(\text{CH}_3)_3\text{-NH}^+ + 9\text{H}_2\text{O}^b \rightarrow 9\text{CH}_4 + 4\text{NH}_4 + 3\text{H}^+ + 3\text{HCO}_3^-$	-76	<i>Methanosarcina</i> y otros metilótrofos
$2(\text{CH}_3)_2\text{-S} + 3\text{H}_2\text{O}^c \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}_2\text{S}$	-49	Algunos metilótrofos
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-113	<i>Methanosphaera</i> <i>stadtmanii</i> , metilótrofos

a) Otros alcoholes de cadena corta se utilizan incluyendo isopropanol. b) Otras aminas metiladas utilizados incluyen metilamina y dimetilamina. c) También se utiliza metilo mercaptano (Zinder, 1993)

Aunque como grupo pueden usar una gran variedad de sustratos, la mayoría de las bacterias metanogénicas están especializadas en uno o dos sustratos, lo que provoca que tengan una gran dependencia de otros organismos. La mayoría son capaces de utilizar el H_2 como aceptor de electrones, mientras que sólo dos géneros son capaces de utilizar el acetato *Methanosarcina* y *Methanothrix* o también conocidos como *Methanosaeta*. Aun así destacan especies del género *Methanosarcina* como *Methanosarcina barkeri* que es capaz de utilizar hasta siete sustratos entre los que se encuentra H_2 y CO_2 , acetato, metanol, metilaminas y CO (Zinder, 1993 y Campos, 2001).

Estos dos géneros presentan características cinéticas diferentes. Las bacterias del género *Methanothrix* destaca en reactores con concentraciones bajas de acetato, y presentan una tasa de crecimiento bajo, por lo que se identifica principalmente en digestores con elevado tiempo de retención y baja concentración de sustrato. En cambio *Methanosarcina* son dominantes a altas concentraciones de acetato (valor K_S superior) y tienen tasas de crecimiento superiores, por ello se las encuentra en reactores con tiempo de retención inferior y alta carga orgánica.

Si hay presentes en el sustrato formas oxidadas de azufre, los microorganismos sulfatoreductores entran en competencia por el sustrato con las metanogénicas. Los sulfatoreductores presentan tasas de crecimiento superiores, debido a que las reacciones de reducción que llevan a cabo son más favorables termodinámicamente, como se puede observar en las siguientes reacciones:



Esto conlleva un gran inconveniente, ya que aparte de disminuir la producción de metano, el sulfuro de hidrógeno (H_2S) es inhibidor de prácticamente todos los microorganismos que actúan en el proceso de digestión anaerobia, a niveles del orden de 2 – 3 mM de H_2S (Flotats, 2014).

1.1.2 Inhibición por amonio

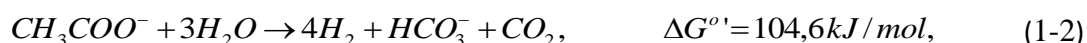
Como resultado de la degradación principalmente de proteínas y urea se obtiene amonio o amoníaco. Estos dos compuestos están en equilibrio químico y sus concentraciones dependen de la temperatura y el pH. El amonio es necesario para el crecimiento microbiano ya que es un nutriente esencial para la producción de proteínas, por lo que a concentraciones bajas es beneficioso para el proceso (Chen *et al.*, 2008). Pero a concentraciones superiores puede producir inhibición del crecimiento. De ambos, el más tóxico es el amoníaco debido a que puede pasar a través de la membrana celular. En la célula causa desequilibrio de protones y deficiencia de potasio. Las bacterias metanogénicas son las más sensibles a esta inhibición (Appels *et al.*, 2008), a concentraciones de amoníaco del rango de 4051-5734 mg de NH_3-N/L , poblaciones acidogénicas apenas se ven afectadas mientras que las poblaciones metanogénicas disminuyen su actividad en un 56,5% (Chen *et al.*, 2008). De estas, se ha observado que las más afectadas son las acetoclásticas.

Como se ha comentado el pH y la temperatura tienen un efecto en el equilibrio de estos compuestos, un aumento en el pH y la temperatura provoca un aumento de la concentración de amoníaco y por lo tanto un aumento de la toxicidad. Pero se han realizado estudios donde se han comparado la inhibición por amoníaco en régimen mesofílico, de entre 30 y 40 °C, y en termofílico, de entre 45 y 65 °C, y se ha observado que la inhibición es superior en el mesofílico, lo que indica que las floras termófilas toleran una mayor concentración de amoníaco (Chen *et al.*, 2008).

Con el fin de minimizar la problemática que conlleva esta inhibición, se han estudiado reactores con alto contenido de amonio y se ha observado que las bacterias hidrogenotróficas juntamente con otras bacterias son capaces de producir metano. Estas últimas con las bacterias SAO (Flotats, 2014).

1.1.3 Oxidación Sintrófica de Acetato (SAO)

Los organismos SAO (Syntrophic Acetate-Oxidizing) es un grupo polifilético de microorganismos que tienen la capacidad de oxidar el acetato produciendo H₂ y CO₂ (1-2). A diferencia del proceso habitual llevado a cabo por las bacterias acetoclásticas que degradan el acetato a metano y tiene una $\Delta G^{o'}$ (kJ/mol)= -135,6, la oxidación de a H₂ y CO₂ tiene una $\Delta G^{o'}$ (kJ/mol)= 104,6 con lo cual no es favorable en condiciones estándar.



Esta reacción bajo la colaboración sintrófica de bacterias consumidoras de hidrógeno, que mantienen una presión parcial baja de H₂, es termodinámicamente favorable. Estas bacterias pueden ser bacterias reductoras de sulfato o metanogénicas hidrogenotróficas. De estas últimas las más habituales son *Methanomicrobiales spp.*, *Methanobacterales spp.* o *Methanococcales spp.* *Methanosarcinaceae spp.*, miembros del género *Methanosarcina*, pueden también, pero en condiciones específicas (Fotidis *et al.*, 2012).

Este proceso se ha observado no solo en digestores, sino que también se ha demostrado que esta vía se produce en diversos entornos naturales como el suelo del campo de arroz, sedimentos lacustres y en pozos de petróleo del subsuelo (Westerholm *et al.*, 2011).

La energía liberada por la oxidación del hidrógeno es de -135,6 kJ/mol, por lo que sumando ambos procesos resulta una $\Delta G^{o'}$ (kJ/mol)= -31,0 y por lo tanto es favorable en condiciones estándar. Esta energía disponible para ambos microorganismos se ve afectada también por los cambios de temperatura y concentraciones de otros sustratos y productos. Por ejemplo, para SAO la $\Delta G'$ se vuelve más favorable a baja presión parcial de H₂ y alta temperatura, mientras que para las hidrogenotróficas se vuelve desfavorable en las mismas condiciones (Hattori, 2008).

Se han documentado hasta el momento seis especies de SAO, tres mesófilas *Clostridium ultunense* strain BST, *Syntrophaceticus schinkii* y *Tepidanaerobacter acetatoxydans* y tres termófilas *Thermacetogenium phaeum* strain (Fig. 1-2), *Thermotoga lettingae* strain TMO y *strain* AOR. De estos últimos, los AOR *strain*, se han calculado las presiones para la que las dos

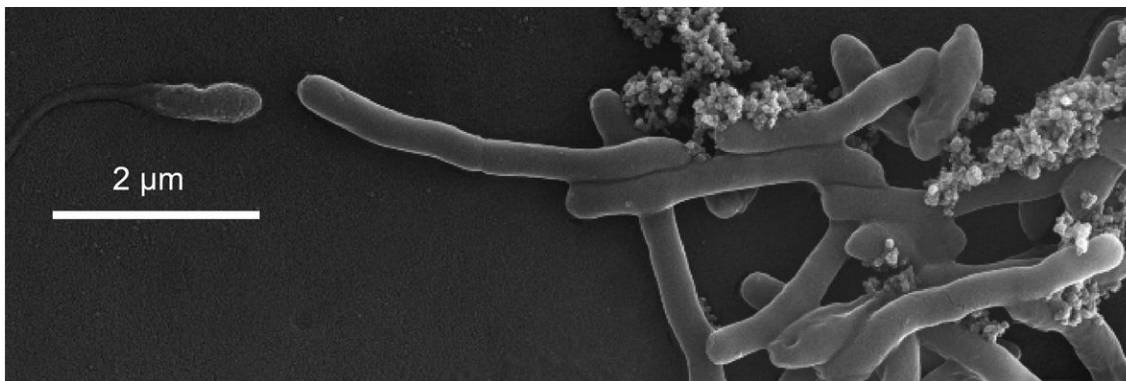


Fig. 1-2. Fotografía tomada con microscopio electrónico de un co-cultivo de *T.phaeum* y *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. A la izquierda se puede observar una célula joven con flagelo y a la derecha células adultas sin flagelo formando agregados (Oehler1 et al., 2012).

reacciones 1-2 y la reductora de CO_2 tienen un $\Delta G'$ igual a 0, para conocer el rango en el cual las reacciones son exergónicas. El rango se encuentra entre 2,6 y 74 Pa de H_2 (se calculó con las siguientes condiciones: 20mM acetato, 30mM HCO_3^- y 35 kPa de metano). En comparación, también se calculó con *Clostridium ultunense* y el rango resultó inferior, como se puede observar en la Fig. 1-3, entre 0,8 Pa y 18 Pa de hidrógeno (calculado con las siguientes condiciones: 30mM acetato, 100mM HCO_3^- y 31 kPa de metano). Esto se produce porque el cocultivo *C. Ultunense*/hidrogenótrofo es mesofílico y las dos reacciones requieren una presión parcial de H_2 inferior que las reacciones en régimen termofílico (Hattori, 2008).

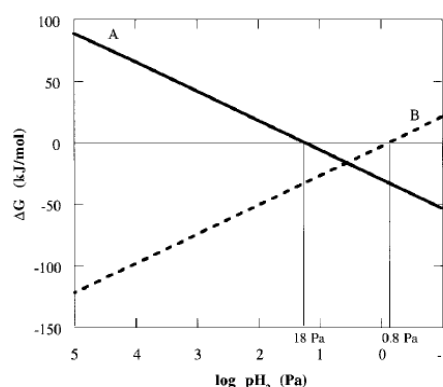
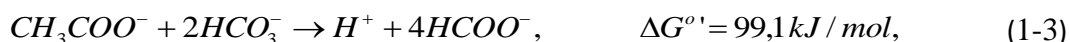


Fig. 1-3. Cambios calculados de energía libre de Gibbs de la oxidación de acetato (A) y la formación de metano (B) a varias presiones parciales de hidrógeno en condiciones aplicadas en el cocultivo (Schnüerer et al., 1997)

Algunos organismos SAO, como *T.phaeum*, también producen formiato mediante la ecuación 1-3 y también es degradado por las bacterias hidrogenotróficas como se puede ver en la Tabla 1-1, por lo que se cree que el formiato es utilizado cuando hay una gran distancia entre las dos comunidades, mientras que la transferencia de hidrógeno se vuelve más favorable cuando estas distancias son pequeñas (Fotidis et al., 2012).



Aun no se sabe exactamente como se reparten la energía las dos comunidades. Se cree que ambas deben compartir equitativamente energía liberada en la reacción, $\Delta G^{0'}$ de solo -15.5 kJ/mol para cada una. Este hecho se ha intentado corroborar mediante la comparación del número de células y/o niveles de proteínas celulares de cada una de las comunidades, aunque estos ensayos no aportan demasiada luz al asunto. En un cocultivo de etanol se estimó el número total de células de AOR strain y resultó un 50 al 60%. También se hizo un cocultivo de *T. phaeum* en acetato, y la relación entre proteínas de SAO y metanógenos resultó aproximadamente 1:1,2.

Además se ha descubierto que algunas bacterias SAO como *T. phaeum* y *T. lettingae* también tienen la capacidad de crecer en solitario en otros substratos mediante fermentación

homoacetogénica como en azúcares, alcoholes o H₂/C₂. Por lo tanto, estos organismos tienen la capacidad de degradar 1 mol de acetato para formar 4 moles de H₂ y a su vez pueden producir la reacción inversa.

Hattori *et al.*, (2005) realizó lo siguiente para comprobar qué ruta metabólica utiliza en cada uno de los procesos. Partieron de un cultivo aislado de *T. phaeum* y un cocultivo con relación sintrófica. A ambos les aplicaron lizosima y mutanolisina como enzimas selectivas para la lisis de *T. phaeum* y no lisar a las metanogénicas. Así consiguen liberar el contenido citoplasmático de las bacterias incluidas las enzimas.

En los extractos extraídos del crecimiento en cocultivo encontraron CODH y tetrahidrofolato vinculado a redox, y como no encontraron 2-oxoglutarato deshidrogenasa sugiere que sigue la vía metabólica de Wood/Ljungdahl, la cual se puede observar en la Fig. 1-4, descartando el ciclo del ácido cítrico.

En el caso del cultivo puro encontraron que estas bacterias tenían exactamente las mismas enzimas, con lo cual se cree que utiliza la misma ruta de forma reversible.

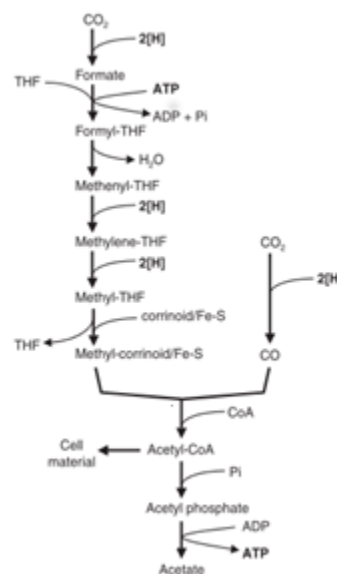


Fig. 1-4. Ruta de Wood/Ljungdahl (Hattori, 2008)

Schnuërer *et al.*, (1997) creen que esto es posible ya que posee dos tipos de metileno-THF deshidrogenasas, una para cada dirección de la ruta de Wood. Una asociada a NAD⁺ y otra a NADP⁺, para la oxidación de acetato y su formación respectivamente. Estas dos enzimas se han descrito en otros organismos previamente en la bibliografía.

Los parámetros cinéticos propuestos hasta el momento para algunos de estos organismos se pueden observar en la Tabla 1-2. Se puede ver que las especies termófilas tienen un tiempo de duplicación inferior al de *C. ultunense* y por lo tanto tendrán un crecimiento más rápido.

Tabla 1-2. Parámetros cinéticos de algunas bacterias SAO (Hattori, 2008).

	strain AOR	<i>T. phaeum</i> strain PB T	<i>C. ultunense</i> strain BS T
En cocultivo			
Tasa máxima(h ⁻¹)	0,0231 - 0,0173	0,0122	0,0014 - 0,0012
Tiempo de duplicación (h)	30 - 40	56,8	480 - 600
pH			
Y		2,4 g masa seca/ mol acetato	
En cultivo puro			
Tasa máxima(h ⁻¹)	0,0578	0,0304	0,0144
Tiempo de duplicación (h)	12	22,8	48
pH		5,9-8,4	5,0 - 10,0
Y	1,1 g masa seca /mol de acetato formado		197 μmol acetato /100 μmol consumido
Substrato	H ₂ /CO ₂	Piruvato	Glucosa

Aunque la mayoría de los SAO establecen simbiosis con los microorganismos hidrogenotróficos, en la bibliografía se ha descrito una especie que no, *Geobacter sulfurreducens* strain PCA. Este es una bacteria reductora de hierro, anaerobia y mesofílica, que cuando se encuentra en un medio pobre en aceptadores de electrones como el hierro o fumarato, puede oxidar el acetato estableciendo simbiosis con nitrato-reductores i/o sulfo-reductores de H₂. A diferencia de los anteriores que tienen un tiempo de duplicación muy largo, *G. sulfurreducens* puede crecer rápidamente en acetato con un tiempo de duplicación de 6-8 horas (en cocultivo con *Wolinella succinogenes*) y 30 horas (en cocultivo con *Desulfovibrio desulfuricans*) (Hattori, 2008).

G. sulfurreducens no es la única especie que tiene capacidad de oxidar acetato en presencia de un aceptor de electrones alternativo. *T. phaeum* y *T. Lettingae* también la poseen, mientras que AOR strain, *C. ultunense*, *S. schinkii* y *T. acetatoxydans* sólo pueden oxidar acetato en cooperación con un metanógeno (Westerholm *et al.*, 2011). Aunque no se ha demostrado que *C. ultunense* tenga esta capacidad, Jiang, S. *et al.*, (2013), aisló una comunidad de bacterias del mismo género *Clostridium* que sí podían reducir el Fe(III) con el acetato. También se observó, como se puede ver en la Fig. 1-5 que el Fe (II) obtenido era oxidado posteriormente y el electrón resultante era utilizado por los metanógenos para producir metano (Jiang *et al.*, 2013).

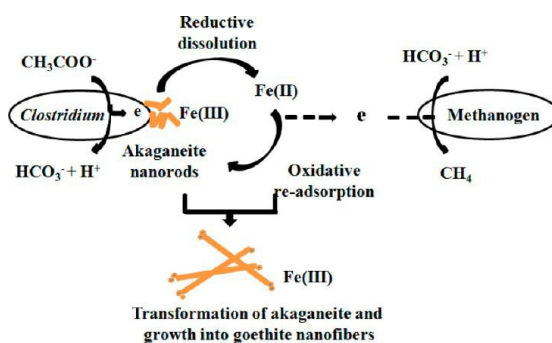


Fig. 1-5. Esquema de la transmisión de electrones entre *Clostridium* y arqueas metanogénicas a través del hierro (Jiang, S. *et al.*, 2013.)

Sun, L. *et al.*, (2013), hicieron un estudio sobre la presencia de SAO en digestores anaerobios de Suecia. Cogieron muestra de 13 reactores distintos, de estos, tres operaban en régimen termofílico (K-M) y el resto en mesofílico (A-J). Observaron que en todas las plantas termofílicas y siete de las plantas mesofílicas, el proceso de metabolización del acetato era llevado a cabo principalmente por las bacterias SAO. Estos reactores mesofílicos eran aquellos que el substrato era una mezcla de componentes y tenían una concentración de amoníaco superior. En cambio aquellas plantas mesofílicas que tienen un solo substrato, el acetato es degradado principalmente por las bacterias acetoclásticas.

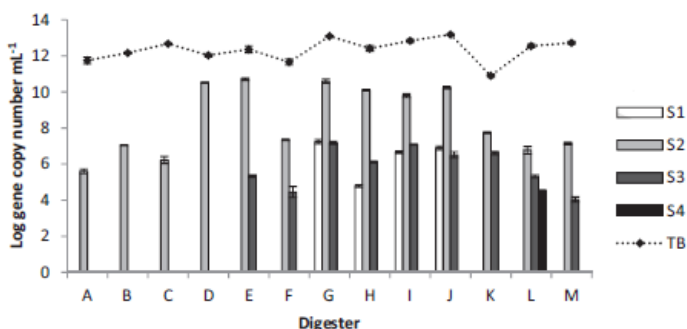


Fig. 1-6. Abundancia de SAO en 13 digestores de biogás a gran escala, expresado como el número de copias del gen diana de ARNr 16S en escala logarítmica. S1, *C. ultunense*; S2, *S. schinkii*; S3, *T. acetatoxydans*; S4, *T. phaeum*; TB, el total de bacterias (Sun *et al.*, 2013).

Además también midieron las especies presentes. *S. schinkii* fue encontrado, como se puede observar en la Fig. 1-6, en todos los reactores, aunque en mayor proporción en aquellos dominados por SAO (D-M); *T. acetatoxydans* se encontró en nueve de los 10 reactores dominados por SAO, pero no se encontró en aquellos dominados por el proceso

acetoclástico. *C. ultunense* solo se encontró en aquellos reactores mesófilicos con una alta concentración de amoníaco G–J. *T. phaeum* solamente fueron encontrados en el reactor termófilico el L, aunque hace falta recalcar que este fue el que tenía una concentración mayor de amoníaco, de 0.82 g/L.

1.2. Modelización

Los modelos matemáticos permiten la representación de los principales aspectos de un sistema biológico. Tienen como objetivo mejorar la comprensión del sistema, la formulación y la validación de hipótesis, predecir el comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones, revelar relaciones entre variables y resumiendo, generar herramientas útiles para optimizar y comprender el proceso (Donoso-Bravo *et al.*, 2011; Flotats, 2014)

Los modelos pueden ser estacionarios, los cuales son útiles en la fase de diseño y dimensionamiento o dinámicos que pueden predecir la evolución del proceso de forma continua, permitiendo estudiar el sistema y ampliar el conocimiento del proceso. (Campos, 2001)

1.2.1. Modelos de digestión anaerobia

Los primeros modelos se centraron en la descripción de los procesos limitantes. Como se ha comentado anteriormente, la digestión anaerobia es un proceso con múltiples fases donde la fase limitante controla la velocidad global. Como esta depende del sustrato y de las condiciones de operación, diferentes autores desarrollaron sus modelos con etapas diferentes. Estos modelos son simples y fáciles de utilizar pero no son capaces de describir el proceso.

Con el incremento del conocimiento en microbiología, los modelos han ido incorporando más detalles cinéticos e inhibición. Aparecieron modelos dinámicos estructurados, que se basan en los mismos principios pero dan un peso especial a un determinado parámetro, considerándolo como principal modulador del proceso.

Finalmente como respuesta a la necesidad de un modelo genérico de la digestión anaerobia, se desarrolló el ADM1 (Donoso-Bravo *et al.*, 2011; Campos, 2001).

1.2.2. Anaerobic Digestion Model No. 1. (ADM1)

El *Anaerobic digestion model 1*, o más conocido como ADM1, es, como su nombre indica, un modelo para simular procesos de digestión anaerobia. Fue desarrollado por el grupo de trabajo sobre modelización de la *International Water Association -IWA-* (Batstone *et al.*, 2002) con el fin de alcanzar una base común para estudios posteriores de desarrollo y validación del modelo con resultados comparables.

El modelo ADM1 describe la dinámica de un reactor donde se desarrollan 24 especies e incluye 19 procesos de bioconversión que se dividen entre hidrólisis, consumo de sustrato y lisis de los microorganismos. Por esa razón es un modelo con un gran número de parámetros. Una de sus características es que presenta notación matricial basada en la matriz de Petersen, lo que

le permite sistematizar la expresión matemática del proceso global ya que varios procesos afectan simultáneamente a varios compuestos. Además como pretende tener un uso general, el ADM1 descuida algunos procesos y especies, que están relacionados con aplicaciones más específicas, con el fin de evitar la complejidad extrema.

La matriz de Petersen, como se puede observar en el ejemplo de la Tabla 1-3 es una matriz que tiene tantas columnas como número de componentes participan, como sustancias químicas, orgánicas y biomasa (en este caso glucosa, fructosa, CO₂ y microorganismos) y tantas filas como número de procesos, principalmente reacciones bioquímicas (en el ejemplo la oxidación de la glucosa y la fructosa). Además, hay una columna adicional donde se agrega la descripción de la cinética de cada bioconversión (en este caso al igual que en ADM1 se utiliza la cinética de Monod).

Las ecuaciones de bioconversión utilizadas para la evolución temporal en el modelo ADM1, se pueden diferenciar en 3 procesos a grandes rasgos. En primer lugar aquella que se refiere al consumo de sustrato sigue una cinética de primer orden respecto a X con una constante de reacción de crecimiento, que depende de la concentración de sustrato S, según la expresión de Monod:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max}}{Y} \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot X \tag{1-4}$$

donde μ_m es la tasa máxima de crecimiento (d⁻¹), Y es la tasa de conversión de sustrato en biomasa y K_s es la constante de saturación, que corresponde a la concentración de sustrato para el que la velocidad de crecimiento o de consumo de sustrato es la mitad de la máxima.

Tabla 1-3. Ejemplo de matriz de Petersen.

Componente Proceso	Glucosa (g)	Fructosa (g)	CO ₂	Microorganismo aerobio		Velocidad de reacción
Oxidación glucosa	-1		1-Yg	Yg	X	$\frac{\mu_{max}}{Y_g} \cdot \frac{g}{K_s+g} \cdot X$
Oxidación fructosa		-1	1-Yf	Yf		$\frac{\mu_{max}}{Y_f} \cdot \frac{f}{K_s+f} \cdot X$

La ecuación 1-4 también puede utilizar diferentes expresiones de Monod de forma multiplicativa, por lo que tiene la posibilidad de añadir términos como múltiples sustratos necesarios para el crecimiento o factores de inhibición no competitiva reversible con valores comprendidos entre 0 y 1, los cuales siguen la fórmula (1-5). El modelo ADM1 considera inhibición por pH, H₂ y amoníaco. Aunque todas las poblaciones de microorganismos están más o menos afectadas por el amoníaco, sólo se considera la inhibición de las metanogénesis acetoclástica ya que los microorganismos que la catalizan son los más sensibles (Flotats, 2014).

$$\frac{K_{is}}{K_{is} + S} \tag{1-5}$$

En segundo lugar la muerte, lisis o pérdida de masa por metabolismo endógeno de los microorganismos, se expresa usualmente mediante una cinética de primer orden respecto a X,

de constante k_d .

Por último, los procesos de desintegración e hidrólisis. Aunque existen otros modelos más elaborados como la cinética de Contois, el ADM1 ha escogido una cinética de primer orden con una constante k de hidrólisis o disociación, dependiendo del proceso. Esta cinética se puede considerar como un caso particular de la cinética de Contois en el que la concentración de la población bacteriana es mucho más elevada que la concentración de sustrato a degradar, de manera que el proceso dependería solamente de esta última concentración (Campos, 2001).

A parte de la hidrólisis, el ADM1 adopta otras simplificaciones. Por ejemplo, de bacterias metanogénicas acetoclásticas sólo considera un género aunque, como se ha comentado anteriormente, entre los géneros existen grandes diferencias. Además, tampoco considera las bacterias sulfato reductoras, entre otros (Flotats, 2014).

A parte de la dinámica microbiana, el ADM1 tiene en cuenta procesos fisicoquímicos. La transferencia de gases entre fases líquida y gaseosa se calcula mediante la aplicación de la ley de Henry, en función de la temperatura, y en función de la diferencia de concentraciones en ambas fases. Además, a partir de las concentraciones y constantes de equilibrio ácido-base de los componentes del sistema, se calcula el pH en cada paso de integración.

1.2.3. Estequiometría variable

El modelo de estequiometría variable consiste en utilizar la termodinámica de las reacciones para calcular la variación de la energía libre de Gibbs de estas y, en función de la energía disponible para el crecimiento microbiano, estimar los parámetros estequiométricos de las reacciones biológicas.

Puesto que el metabolismo cambia en función de múltiples factores, algunos autores como Rodríguez *et al.*, (2008) argumentan que existen varias razones por las cuales modelos de cinética utilizados actualmente, como el ADM1, se pueden mejorar mediante la estequiometría variable.

En los modelos actuales a menudo se diferencian las comunidades microbianas en varias especies o grupos dependiendo de su función. Esta segregación ha demostrado ser muy exitosa en sistemas aerobios. Sin embargo, dicha distribución puede causar problemas en sistemas anaeróbicos, en los que los microorganismos tienen similares tasas de crecimiento y rendimientos y puede que varios de ellos realicen las mismas reacciones fermentativas en paralelo. Si numerosos grupos microbianos que compiten han de considerarse en un modelo, se requieren extensas estimaciones de los parámetros cinéticos y estequiométricos con el fin de describir su comportamiento experimental. Esto causa problemas de identificación debido a la cuantificación problemática de los diferentes grupos microbianos en una comunidad microbiana mixta.

Además se le podría sumar el hecho de que la mayoría de organismos anaerobios tienen la capacidad de producir un gran número de productos, los cuales dependen de la termodinámica del sistema entre otros factores. Esta variabilidad de productos también afecta el rendimiento de crecimiento de la biomasa.

A menudo los modelos descuidan limitaciones energéticas y termodinámicas, lo cual podría producir predicciones poco realistas, como la catálisis de reacciones endergónicas que son imposibles de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica. Esto es muy posible debido a que muchas reacciones anaerobias se encuentran cerca del equilibrio termodinámico, con valores muy bajos de ΔG y son termodinámicamente factibles si las concentraciones de los reactivos y productos se encuentran dentro de un rango estrecho.

Un ejemplo de ello es la transferencia de hidrógeno entre los microorganismos productores y los consumidores. Estos, como se ha explicado anteriormente en el caso de las bacterias SAO, pueden coexistir sólo termodinámicamente si la concentración de hidrógeno se mantiene a un valor muy bajo por las bacterias hidrogenotróficas.

Con el fin de mejorar estas limitaciones Rodríguez *et al.*, (2005), realizaron un modelo incorporando dicha metodología. Consideraron un organismo virtual capaz de realizar las vías de fermentación de la glucosa más comunes y asumieron que los productos producidos serían aquellos que generarán una mayor energía. Esta la calcularon con la fórmula siguiente:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ'} + R \cdot T \cdot \ln \left(\prod_j a_j^{y_j} \right) \quad (1-6)$$

En la que “a” es la actividad de cada componente de la reacción, y “y” es el coeficiente estequiométrico es esta. Además también tuvieron en cuenta el efecto del pH en el transporte entre membranas.

Penumathsa, *et al.*, (2008) introdujeron la estequiometría variable en ADM1 para substituir los parámetros estequiométricos relativos a producción de hidrógeno a partir de glucosa. Así en cada paso de integración estos parámetros eran cálculos en función de la bioenergética de las reacciones llevadas a cabo por los microorganismos.

1.3. Estimación de parámetros

Los modelos de digestión anaerobia no son universales por lo que los parámetros de cada uno son particulares en cada caso. Para encontrar el mejor ajuste del modelo a los datos experimentales, es necesario seleccionar un criterio adecuado para la solución óptima de los parámetros. Uno muy extendido es el uso de funciones objetivo a minimizar. Una gran variedad de estas se han utilizado para la identificación de parámetros, de los que la más usual es la suma de los cuadrados de las diferencias entre valores experimentales y valores predichos por el modelo. Para la optimización de la función objetivo se han desarrollado varios algoritmos los cuales buscan de forma numérica los valores óptimos de los parámetros. Estos algoritmos se pueden dividir entre algoritmos locales y globales. La mayoría de la información ha sido obtenida a partir de Donoso-Bravo *et al.*, (2011).

1.3.1. Métodos locales

Generalmente los métodos empleados para la optimización son de naturaleza local, es decir asumen la convexidad de la función objetivo. Si esta condición no se cumple, el algoritmo puede quedar atrapado en un mínimo local. Para solventar este problema, se recomienda

iniciar la búsqueda de varios valores de los parámetros iniciales seleccionados al azar con el fin de explorar el espacio de parámetros. Hay dos familias de métodos, los primeros presentan un enfoque de optimización secuencial. El algoritmo evalúa repetidamente la función objetivo, a partir de un integrador que numéricamente soluciona las ecuaciones dinámicas del modelo. Es el caso de la optimización simple sin restricciones y con restricciones. En cambio hay una segunda familia de métodos que utilizan un enfoque simultáneo, es decir, discretizan las ecuaciones diferenciales del modelo y utiliza las ecuaciones algebraicas resultantes como restricciones del algoritmo. En este grupo entran los métodos de disparo múltiple o de búsqueda directa.

1.3.1.1. Optimización simple sin restricciones

Existen varios métodos que se pueden englobar en esta categoría. En primer lugar el descenso por gradiente, el cual es un método iterativo que utiliza información de primer orden para disminuir en la dirección del gradiente para encontrar el mínimo de la función, tomando pasos proporcionales a la pendiente. Con este método a menudo se requieren un gran número de iteraciones para lograr la convergencia.

En segundo lugar el método Gauss-Newton, el cual es muy apropiado para la minimización de la suma de cuadrados y tiene la ventaja que evita la costosa evaluación de segundas derivadas en una matriz hessiana, mediante la construcción de una matriz jacobiana, matriz formada por las derivadas parciales de la función, respecto de los parámetros, preservando al mismo tiempo la convergencia cuadrática del método original de Newton.

Por último el método Levenberge-Marquard (LMA), que combina los dos métodos anteriores. LMA comienza generalmente con el método de descenso por gradiente y se convierte progresivamente en el método Gauss-Newton a medida que se acerca al óptimo. De esta manera, el algoritmo es más robusto que Gauss-Newton y logra una mejor convergencia que el descenso por gradiente.

1.3.1.2. Optimización no lineal restringida: programación cuadrática secuencial

La programación cuadrática secuencial es un método iterativo que resuelve, para cada iteración, una aproximación cuadrática de la función objetivo, la cual está sujeta a una liberalización de las restricciones. Si el problema a optimizar no tiene restricciones, este método se reduce al método de Newton.

1.3.1.3. Múltiple disparo.

Este método discretiza el intervalo de tiempo en intervalos de tiempo menores y se introducen nuevas variables de optimización que corresponden a las condiciones iniciales de cada intervalo de las variables de estado. Un conjunto de condiciones de contorno asegura la continuidad de la solución. Como la integración se lleva a cabo en intervalos de tiempo cortos, la estabilidad numérica del algoritmo se ve mejorada.

1.3.1.4. Método de búsqueda directa

Estos métodos son considerados libres de derivadas, están basados en números aleatorios dentro de una región restringida. A partir de los números aleatorios se realiza un examen secuencial de las soluciones de prueba, estas se comparan entre sí mediante una función objetivo y se escoge el “más óptimo”. Después de cada iteración, la amplitud de la región se disminuye, centrando cada vez más en el resultado más óptimo.

Sus inicios se encuentran en los sesenta, pero actualmente se sigue utilizando ya que es muy sencillo de utilizar y se obtienen buenos resultados (Luus y Jaakola, 1973).

1.3.2. Métodos Globales

A diferencia de los métodos locales, la Optimización Global está dirigida a encontrar el mínimo global de un problema no lineal. Este grupo de métodos se pueden dividir entre deterministas o estocásticos.

Métodos deterministas pueden proporcionar un nivel alto de seguridad de donde se encuentra el óptimo global. Se han realizado recientemente importantes avances en optimización global en algunos sistemas dinámicos no lineales. Este grupo de métodos incluye entre otros *grid search* y *branch and bound*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, aunque pueden garantizar el óptimo global para ciertos problemas, ningún algoritmo puede resolver los problemas generales con certeza en un tiempo finito. De hecho, a pesar de que tienen propiedades de convergencia teóricas, los costes computacionales aumentan muy rápidamente con el tamaño del problema.

Los métodos estocásticos por el contrario, pueden localizar los valores cercanos a las soluciones globales con relativa eficiencia y en tiempo de cálculo menor a los anteriores, pero tienen un inconveniente, el óptimo global no se puede garantizar. Además, estos métodos por lo general, son más sencillos de implementar y usar, y no requieren la transformación del problema original, este puede ser tratado como un cuadro negro (Moles *et al.*, 2003). Algunos ejemplos son: *simulated annealing*, *tabu search*, *genetic algorithms*, *differential evolution*, *ant colony optimization* y *particle swarm optimization*.

2.Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es la implementación en el modelo ADM1 de la población SAO.

El objetivo general se divide en los siguientes objetivos parciales:

- Implementación de la población SAO en el modelo ADM1 utilizando la misma tipología de programación.
- Desarrollo de las ecuaciones correspondientes a estequiometría variable de las poblaciones directamente involucradas en la dinámica del ácido acético y el hidrógeno e implementación en el modelo ADM1, modificando las ecuaciones correspondientes.
- Simulación y comparación de ambos modelos.
- Implementación de un algoritmo de optimización de parámetros, para la identificación de la población SAO.
- Obtener valores de parámetros cinéticos de SAO mediante el algoritmo de optimización y los datos experimentales de un trabajo final de grado que se ha realizado en paralelo.

3. Material y métodos

3.1. Incorporación de bacterias SAO en el modelo ADM1

Sé adaptó el modelo ADM1, implementado en MATLAB (The Mathworks, EUA), para poder incorporar una nueva población bacteriana, las bacterias SAO.

El modelo ADM1 tiene establecidos diecinueve procesos. Los procesos que se llevan a cabo se pueden resumir en la desintegración e hidrólisis de compuestos particulados, el consumo de sustratos y la lisis de microorganismos. Como se comentó anteriormente, en la matriz de Pertersen cada fila es un proceso distinto, por lo tanto la matriz tiene diecinueve filas. Para la implantación de esta nueva población se añadieron tres nuevos procesos: El consumo de acetato por parte de las bacterias SAO, el consumo de H₂ de estas mismas y su lisis.

En la Tabla 3-1 se pueden observar todos los procesos considerados.

Tabla 3-1. Procesos considerados

1	Desintegración	12	Consumo hidrógeno
2	Hidrólisis carbohidratos	13	Lisis de Xsu
3	Hidrólisis proteínas	14	Lisis de Xaa
4	Hidrólisis lípidos	15	Lisis de Xla
5	Consumo Azúcar	16	Lisis de Xc4
6	Consumo Aminoácidos	17	Lisis de Xpro
7	Consumo LCFA	18	Lisis de Xac
8	Consumo valerato	19	Lisis de Xh2
9	Consumo butarato	20	Consumo acetato SAO
10	Consumo propionato	21	Lisis de Xsao
11	Consumo acetato	22	Consumo H ₂ SAO

Como se comentó también en la introducción las columnas de la matriz equivalen a las variables. En este caso el ADM1 considera veinticuatro variables indicadas en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2. Variables consideradas

Ssu	Monosacáridos	Xc	Composites
Saa	Aminoácidos	Xch	Carbohidratos
Sta	Ácidos grasos de cadena larga (LCFA)	Xpr	Proteínas
Sva	Valerato total	Xs	Lípidos
Sbu	Butarato total	Xsu	Degradadores de azúcares
Spro	Propionato total	Xaa	Degradadores de aminoácidos
Sac	Acetato total	Xfa	Degradadores de LCFA
Sh₂	Hidrógeno gas	Xc₄	Degradadores de valerato y butarato
Sch₄	Metano gas	Xpro	Degradadores de propionato
Sic	Carbono inorgánico	Xac	Degradadores de acetato
Sin	Nitrogeno inorgánico	Xh₂	Degradadores de hidrógeno
SI	Solubles inertes	Xi	Partículas inertes

Para introducir los tres nuevos procesos se realizaron modificaciones en la matriz original de Pertersen que establece el ADM1. Se añadieron tres filas una por proceso, y una columna

referente a una nueva variable, la concentración de bacterias SAO (X_{SAO}). En las Tablas 3-5 y 3-6 se puede observar la matriz propuesta por ADM1, más los tres procesos adicionales.

En cuanto a los parámetros cinéticos y estequiométricos se escogieron los del ADM1 (Tabla 3-3 y Tabla 3-4). Aquellos de relevancia para el trabajo son los de organismos acetoclásticos, hidrogenotróficos y SAO. Para estos últimos se eligieron aquellos encontrados en la bibliografía mostrados en la introducción, para el término de inhibición por H_2 , se escogió un valor similar al de otros organismos inhibidos descritos en el ADM1. En el caso de la Y en mesofílico se supuso la misma que en termofílico.

Tabla 3-3. Parámetros estequiométricos

Parámetros adimensionales	Descripción	Valor
$f_{si.xc}$	Fracción de inertes solubles procedentes de composites	0.1
$f_{xi.xc}$	Fracción de partículas inertes procedentes de composites	0.25
$f_{ch.xc}$	Fracción de carbohidratos procedentes de composites	0.20
$f_{pr.xc}$	Fracción de proteínas procedentes de composites	0.20
$f_{li.xc}$	Fracción de lípidos procedentes de composites	0.25
N_{xc}, N	Fracción de nitrógeno procedente de composites y inertes	0.002
$f_{fa.li}$	Fracción de ácidos grasos procedentes de lípidos	0.95
$f_{h2.su}$	Fracción de h_2 procedente de azúcares	0.19
$f_{bu.su}$	Fracción de butarato procedente de azúcares	0.13
$f_{pro.su}$	Fracción de propionato procedente de azúcares	0.27
$f_{ac.su}$	Fracción de acetato procedente de azúcares	0.41
$f_{h2.aa}$	Fracción de h_2 procedente de proteínas	0.06
N_{aa}	Fracción de nitrógeno procedente de proteínas	0.007
$f_{va.aa}$	Fracción de valerato procedente de amino ácidos	0.23
$f_{bu.aa}$	Fracción de butarato procedente de amino ácidos	0.26
$f_{pro.aa}$	Fracción de propionato procedente de amino ácidos	0.05
$f_{ac.aa}$	Fracción de acetato procedente de amino ácidos	0.4

Tabla 3-4. Parámetros cinéticos

Parámetro	Mesofílico	Termofílico
K_m ac (DQO/DQO-d)	8	16
K_s ac (gDQO/L)	0,15	0,3
Y_{ac} (DQO/DQO)	0,05	0,05
pH Lower level ac	6	6
pH Upper level ac	7	7
K_{inh3}	0,0018	0,011
K_m h_2 (DQO/DQO-d)	35	35
K_s h_2 (gDQO/L)	7,00E-05	5,00E-06
Y_{h2} (DQO/DQO)	0.06	0.06
pH Lower level h_2	5	5
pH Upper level h_2	6	6
K_m SAO(DQO/DQO-d)	0,651	5,500
K_s SAO (gDQO/L)	0,503	0,503
Y_{SAO} (DQO/DQO)	0,053	0,053
pH Lower level SAO	5	5,9
pH Upper level SAO	7	7
K_{inh2} (gDQO/l)	200e-5	200e-5

Tabla 3-5. Matriz de Petersen utilizada en ADM1 del componente 1 al 13.

Componente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Proceso	Ssu	Saa	Sta	Sva	Sbu	Spro	Sac	Sh2	Sch4	Sic	Sin	Si	Xc
1												FxLxc	-1
2	1												
3		1											
4	1-f _{ali}		f _{ali}										
5	-1				(1-Y _{su})·f _{bu,su}	(1-Y _{su})·f _{pro,su}	(1-Y _{su})·f _{ac,su}	(1-Y _{su})·f _{h2,su}		$\sum_i C_i \cdot v_{i5}$			-(Y _m) N _{bac}
6		-1		(1-Y _{aa})·f _{va,aa}	(1-Y _{aa})·f _{bu,aa}	(1-Y _{aa})·f _{pro,aa}	(1-Y _{aa})·f _{ac,aa}	(1-Y _{aa})·f _{h2,aa}		$\sum_i C_i \cdot v_{i6}$			N _{aa} ·(Y _{aa})N _{bac}
7			-1				(1-Y _{la})·0,7	(1-Y _{la})·0,3					-(Y _{fa}) N _{bac}
8				-1		(1-Y _{c4})·0,54	(1-Y _{c4})·0,31	(1-Y _{c4})·0,15					-(Y _{c4}) N _{bac}
9					-1		(1-Y _{c4})·0,8	(1-Y _{c4})·0,2					-(Y _{c4}) N _{bac}
10						-1	(1-Y _{pro})·0,57	(1-Y _{pro})·0,43		$\sum_i C_i \cdot v_{i10}$			-(Y _{pro}) N _{bac}
11							-1		(1-Y _{ac})	$\sum_i C_i \cdot v_{i11}$			-(Y _{ac}) N _{bac}
12								-1	(1-Y _{h2})	$\sum_i C_i \cdot v_{i12}$			-(Y _{h2}) N _{bac}
13													1
14													1
15													1
16													1
17													1
18													1
19													1
20							-1	(1-Y _{sa01})		$\sum_i C_i \cdot v_{i20}$			-(Y _{sa01}) N _{bac}
21													1
22							(1-Y _{sa02})	-1		$\sum_i C_i \cdot v_{i22}$			-(Y _{sa02}) N _{bac}

Tabla 3-6. Matriz de Petersen ADM1 del componente 14 al 25 más el vector de velocidades de reacción.

Componente	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Velocidad de reacción
Proceso	Xch	Xpr	Xs	Xsu	Xaa	Xfa	Xc4	Xpro	Xac	Xh2	Xi	Xsao	
1	$f_{ch,xc}$	$f_{or,xe}$	$f_{li,xc}$										$K_{dis} \cdot X_c$
2	-1												$K_{hyd,ch} \cdot X_{ch}$
3		-1											$K_{hyd,pr} \cdot X_{pr}$
4			-1										$K_{hyd,li} \cdot X_{li}$
5				Y_{su}									$K_{msu} \cdot \frac{S_{su}}{S_{su} + K_s} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot X_{su}$
6					Y_{aa}								$K_{maa} \cdot \frac{S_{aa}}{S_{aa} + K_s} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot X_{aa}$
7						Y_{fa}							$K_{mfa} \cdot \frac{S_{fa}}{S_{fa} + K_s} \cdot \frac{K_{I_{H_2}}}{K_{I_{H_2}} + S_{H_2}} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot X_{fa}$
8							Y_{c4}						$K_{m.c4} \cdot \frac{S_{va}}{S_{va} + K_s} \cdot \frac{K_{I_{H_2}}}{K_{I_{H_2}} + S_{H_2}} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot \frac{S_{va}}{S_{va} + S_{bu}} \cdot X_{c4}$
9							Y_{c4}						$K_{m.c4} \cdot \frac{S_{bu}}{S_{bu} + K_s} \cdot \frac{K_{I_{H_2}}}{K_{I_{H_2}} + S_{H_2}} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot \frac{S_{bu}}{S_{va} + S_{bu}} \cdot X_{c4}$
10								Y_{pro}					$K_{mpro} \cdot \frac{S_{pro}}{S_{pro} + K_s} \cdot \frac{K_{I_{H_2}}}{K_{I_{H_2}} + S_{H_2}} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot X_{pro}$
11									Y_{ac}				$K_{mac} \cdot \frac{S_{ac}}{S_{ac} + K_s} \cdot \frac{K_{I_{NH_3}}}{K_{I_{NH_3}} + NH_3} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot X_{ac}$
12									Y_{h2}				$K_{mh2} \cdot \frac{S_{H_2}}{S_{H_2} + K_s} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot X_{h2}$
13				-1									$K_{dsu} \cdot X_{su}$
14					-1								$K_{daa} \cdot X_{aa}$
15						-1							$K_{dfa} \cdot X_{fa}$
16							-1						$K_{dc4} \cdot X_{c4}$
17								-1					$K_{dpro} \cdot X_{pro}$
18									-1				$K_{dac} \cdot X_{ac}$
19										-1			$K_{dh2} \cdot X_{h2}$
20												Y_{sao1}	$K_{msao} \cdot \frac{S_{ac}}{S_{ac} + K_s} \cdot \frac{K_{I_{H_2}}}{K_{I_{H_2}} + S_{H_2}} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot X_{SAO}$
21												-1	$K_{dsao} \cdot X_{SAO}$
22												Y_{sao2}	$K_{mhsao} \cdot \frac{S_{H_2}}{S_{H_2} + K_s} \cdot \frac{S_N}{S_N + K_{SN}} \cdot I_{ph} \cdot X_{SAO}$

Como se puede observar en la Tabla 3-6 se ha considerado como sustrato una fuente de nitrógeno y de carbono. Las inhibiciones de H_2 y NH_3 están expresadas con una fórmula de inhibición no competitiva tal y como se había argumentado en la introducción. En el caso del amoníaco, se calculó la concentración en cada paso de integración a partir del pKa en función de la temperatura.

Para calcular el termino de inhibición por pH, se utilizó una expresión simplificada (3-1), en la que asume que tiene información de inhibición a pH ácidos completa por debajo de un valor óptimo de pH (pH_{LI}), y sin inhibición por encima del óptimo (pH_{LS}).

$$I_{pH} = \exp\left(-3\left(\frac{pH - pH_{LS}}{pH_{LS} - pH_{LI}}\right)^2\right) \quad \text{si } pH < pH_{LS}; \quad I_{pH} = 1 \quad \text{si } pH > pH_{LS} \quad (3-1)$$

Para la resolución de las ecuaciones diferenciales, se utilizó una rutina de MATLAB (ode15s), la cual ya estaba incorporada en la versión dada por el tutor.

Esta rutina necesita obligatoriamente los siguientes dos inputs:

- Odefun: La función la cual evalúa para determinar el lado correcto de la ecuación diferencial.
- Tspan: Es el vector donde se especifica el intervalo de integración.

Y presenta los siguientes outputs:

- T: es la columna con los valores de tiempo.
- Y: Son las soluciones de la integración. Cada fila de Y corresponde a la solución correspondiente de T.

Después, además, se le asignaron otros inputs opcionales:

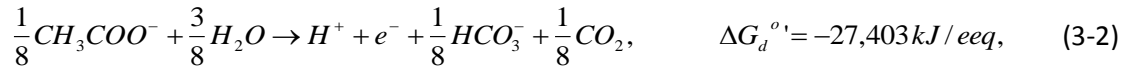
- RelTol: Tolerancia de error relativo que se aplica a todos los componentes de la solución vector Y.
- AbsTol: Tolerancias de error absolutos que se aplican a los componentes individuales del vector solución.
- MaxStep: El tamaño máximo de paso para la convergencia filtro adaptativo. Es útil si la ecuación diferencial tiene coeficientes o soluciones periódicas, ya que garantiza que el solucionador no amplía demasiado el intervalo de tiempo y pasa por alto algún periodo de interés.

3.2 Estequiometría variable

A parte de implementar la población SAO con la tipología de ecuación de ADM1, se implementó con estequiometría variable, con el fin de observar las posibles diferencias entre los dos métodos. Por lo tanto se realizó un estudio de la bioenergética de estos microorganismos. Además también se realizó de los metanógenos hidrogenotróficos y acetoclásticos.

La bioenergética se estudió mediante el modelo de termodinámica de electrones equivalentes presentado en el artículo de McCarty, (2007).

Primeramente se observa la semireacción donadora de electrones (Rd) en condiciones estándar.



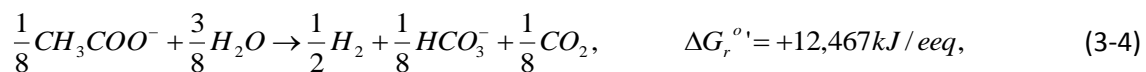
Para calcular la energía en condiciones fuera de las estándar se utiliza la fórmula (1-6), en este caso la siguiente ecuación:

$$\Delta G_d = \Delta G_d^{o'} + R \cdot T \cdot \log \left(\frac{[CO_2]^{\frac{1}{8}} \cdot [HCO_3^-]^{\frac{1}{8}}}{[CH_3COO^-]^{\frac{1}{8}} \cdot [H_2O]^{\frac{3}{8}}} \right) \quad (3-3)$$

En la que R = 8,314·10⁻³ [bar·m³/kmol·K], la temperatura (T) en [K] y las concentraciones en [Kmol/m³].

Durante las simulaciones se utilizará esta ecuación para conocer la energía libre en cada paso de integración y utilizarla para los cálculos posteriores.

Posteriormente se suman la semireacción donadora de electrones y la de la aceptadora de electrones para obtener la reacción total.



Y al igual que antes, la ecuación siguiente se utiliza para calcular la energía fuera de condiciones estándar. Para que la reacción sea exergónica (ΔG_r) debe ser un número negativo. Si no es así, se asumirá que la energía de reacción es -1·10⁻¹⁰ para evitar discontinuidades del integrador.

$$\Delta G_r = \Delta G_r^{o'} + R \cdot T \cdot \log \left(\frac{[CO_2]^{\frac{1}{8}} \cdot [HCO_3^-]^{\frac{1}{8}} \cdot [H_2]^{\frac{1}{2}}}{[CH_3COO^-]^{\frac{1}{8}} \cdot [H_2O]^{\frac{3}{8}}} \right) \quad (3-5)$$

La energía libre de síntesis celular (ΔG_s) es la energía requerida para sintetizar un equivalente de células. Este consiste en la suma de dos términos energéticos (3-6).

$$\Delta G_s = \frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{pc}}{\varepsilon} \quad (3-6)$$

En primer lugar (ΔG_p) es la conversión del donador de electrones a un compuesto intermedio. Este compuesto intermedio es acetil-CoA, considerado como el principal compuesto intermedio en la síntesis, el cual tiene un poder de reducción de 30,9 kJ/eq.

$$\Delta G_p = 30,9 - \Delta G_d \quad (3-7)$$

El valor de (n) depende de si (ΔG_p) es positivo o negativo. En caso que sea positivo la energía es utilizada para transformar la fuente de carbono celular en el compuesto intermedio (en este caso acetil-CoA), y $n = 1$. En cambio si es negativo, la energía es obtenida a partir de la conversión a sí mismo y $n = -1$.

En segundo lugar la conversión del producto intermedio a biomasa celular (ΔG_{pc}) , esta energía es igual a 18,8 kJ/eeq. Esta fue estimada a partir de valores citados de ATP en moles requeridos para la síntesis de células, y asumiendo una composición relativa celular de $C_5H_7O_2N$ y que la fuente de nitrógeno es el amonio.

(ϵ) es la eficiencia de transmisión de electrones, ya que siempre hay pérdidas, en este caso se utilizara en primer lugar un valor hipótesis de eficiencia del 45%.

Una vez calculada la energía necesaria para sintetizar un equivalente de células, se puede estimar cuanto donador de electrones hace falta oxidar para conseguir esta energía (A) a partir de (ΔG_r) y (ΔG_s) .

$$A = \frac{\Delta G_s}{\epsilon \cdot \Delta G_r} \quad (3-8)$$

A partir de A, se puede estimar la fracción de equivalentes que son utilizados para la síntesis celular (f_s), esta fracción corresponde al rendimiento (Y) expresado en las unidades (eeq/eeq donador).

$$f_s = \frac{1}{1 + A} = Y \left(\frac{e^- eq \text{ célula}}{e^- eq \text{ donador}} \right) \quad (3-9)$$

El resto sobrante f_e es utilizado como energía:

$$f_e = 1 - f_s \quad (3-10)$$

La velocidad específica máxima de uso de substrato (\hat{q}) está controlada por el flujo de electrones al aceptador. A 20°C, el caudal máximo a la reacción de la energía (\hat{q}_e) es de aproximadamente 1 éeq/g SSV·d. \hat{q} se puede calcular de la siguiente forma:

$$\hat{q} = \frac{\hat{q}_e}{f_e} \quad (3-11)$$

La temperatura afecta a \hat{q} , por lo que se puede aproximar a partir de la siguiente ecuación:

$$\hat{q}_T = \hat{q}_{20} \cdot (1.07)^{T-20} \quad (3-12)$$

La velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) se estima mediante Y y \hat{q} de la siguiente forma:

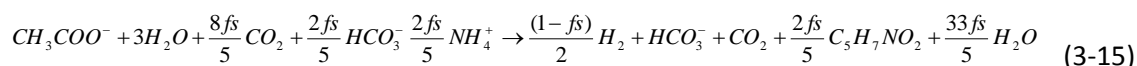
$$\mu = Y \cdot q \quad (3-13)$$

Aunque se intentará eliminar Monod del modelo, fue necesario incorporar finalmente el término de saturación por sustrato y la inhibición por pH, ya que no está contemplado en la bioenergética de la de la reacción, y evita algunos problemas de integración. Por lo tanto quedo la velocidad de reacción siguiente:

$$K_{ma\ sao} \cdot \frac{S_{ac}}{S_{ac} + K_s} \cdot I_{pH} \cdot X_{SAO} \quad (3-14)$$

Donde Km es calculada con las variables obtenidas anteriormente ($K_m = \mu/Y$).

Para conocer el balance de carbono inorgánico y de nitrógeno, se realizó la reacción global en función de fs y un mol de acetato.



El balance del carbono inorgánico es $2-2fs$ y el del nitrógeno $-2fs/5$. Por lo tanto habrá un consumo de nitrógeno inorgánico, y un consumo o una producción de carbono dependiendo de fs.

Estos cálculos, también se realizaron para la reacción llevada a cabo por los hidrogenótrofos y los acetoclásticos. En el caso de estos últimos, además de mantener la inhibición por pH, también se mantuvo la inhibición por amoníaco, puesto que esta no tiene un origen termodinámico.

3.3 Comparación ADM1 con estequiometría variable

Se realizaron distintas simulaciones con el fin de observar diferencias en la dinámica de ambos métodos.

En primer lugar se realizó una prueba con concentraciones iniciales de organismos SAO y acetoclásticos igual, y diferentes concentraciones de nitrógeno inorgánico (PNdif, Tabla 3-7). La concentración inicial de organismos hidrogenotróficos fue elevada, para asegurar una presión parcial de H_2 baja.

Taula 3-7. Concentraciones iniciales (PNdifT)			
	1	2	3
Xsao (gDQO/L)	1,00E-02	1,00E-02	1,00E-02
Xac(gDQO/L)	1,00E-02	1,00E-02	1,00E-02
Xh2 (gDQO/L)	0,5	0,5	0,5
N (mol/L)	0,1	0,3	0,5
Ac(gDQO/L)	10	10	10

También se realizó una prueba con diferentes concentraciones de hidrogenotróficos y una concentración de nitrógeno constante (PH2difT, Tabla 3-8) con el fin de observar las diferencias de inhibición por el hidrógeno.

Taula 3-8. Concentraciones iniciales (PH2difT)

	1	2	3	4
Xsao (gDQO/L)	1,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	1,00E-02
Xac(gDQO/L)	1,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	1,00E-02
Xh2 (gDQO/L)	0,1	0,5	1	2
N (mol/L)	0,3	0,3	0,3	0,3
Ac(gDQO/L)	10	10	10	10

Por tal de poder comparar también como se desarrolla la evolución de EV en mesofílico, se realizaron las mismas simulaciones de PH2difT.

3.4 Obtención de datos experimentales

Se utilizaron los datos obtenidos de un trabajo final de grado paralelo (García, 2014). En este se ha realizado un ensayo de actividad metanogénica que consistió en utilizar experimentos batch simultáneos, en viales de 1200ml, con 700ml de líquido. Se eliminó el O₂ del volumen gas, y se incubaron a 37°C. En el medio de cultivo, se utilizaron diferentes concentraciones de acético y amonio, para observar el desarrollo de un inóculo con posible actividad SAO.

Estos viales fueron realimentados cuando el acetato se agotó, realizando dos alimentaciones más aparte de la inicial. En la Tabla 3-9, se presentan las diferentes concentraciones aplicadas.

Tabla 3-9. Alimentaciones por vial

Experimento	Acetato ($g L^{-1}$)	H ₂ (mL)	N($g L^{-1}$)
1	0	0	0,64
2	1	50	0,82
3	2	50	1,01
4	3	50	1,29
5	3	50	0,68
6	3	50	1,67
7	3	50	2,06
8	3	50	2,43

3.5 Algoritmo aplicado para la optimización de parámetros

Para la optimización de datos experimentales, se utilizó un método Direct search, más concretamente, un método propuesto por Luus y Jaakola, (1973). Este es un algoritmo el cual emplea números aleatorios dentro de un intervalo escogido, y se seleccionan tantos como variables a optimizar. Estos números aleatorios son utilizados para realizar una simulación. Los

datos obtenidos de la simulación se comparan con datos experimentales, mediante una función objetivo, en este caso se ha utilizado la expresión R^2 (3-16).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(X_{Predicho} - X_{Experimental})^2}{\sum(X_{Experimental} - \bar{X}_{Experimental})^2} \quad (3-16)$$

Después de cada iteración, el tamaño de la región se reduce de modo que el óptimo quede dentro del intervalo, dándole la tolerancia de error deseada.

Se ha escogido este método porque ya ha sido utilizado anteriormente para problemas multimodales, y se han obtenido buenos resultados (Flotats *et al.*, 2003 y Flotats *et al.*, 2006) y la ventaja respecto otros métodos ya implementados es MATLAB, es que al estar escrito por ti mismo, es más sencillo localizar un posible error.

El algoritmo se fue implementando poco a poco. En primer lugar se realizó una prueba para obtener las constantes de una ecuación de segundo grado. Esta ecuación se escribió en Excel a fin de simular datos experimentales, y también se incorporó en el algoritmo con las constantes como incógnita.

En la segunda prueba se juntaron el modelo ADM1 y el algoritmo de optimización, creando un algoritmo único. Un diagrama de flujo de este algoritmo se puede observar en la Fig. 3-1. Para obtener “datos experimentales” se realizaron simulaciones con el modelo ADM1 cambiando las condiciones iniciales y se guardaron los datos obtenidos en un Excel. Posteriormente se seleccionaron algunos parámetros cinéticos y concentraciones iniciales como incógnita.

Finalmente ya se procedió a la estimación de incógnitas en los datos experimentales reales. El experimento 1 al ser el blanco, no se utilizó. En cuanto al ADM1, el proceso 22 se eliminó ya que este no ha sido descrito para las bacterias mesófilas. Las incógnitas consideradas fueron las siguientes: Concentración inicial de microorganismos acetoclásticos, microorganismos SAO y microorganismos hidrogenotróficos; K_m SAO, constante de saturación SAO, K_m acetoclástica, K_s acetoclástica y constante de inhibición por amoníaco acetoclástica. Los intervalos de búsqueda proporcionados fueron los siguientes:

Tabla 3-10. Intervalo de las variables a optimizar.

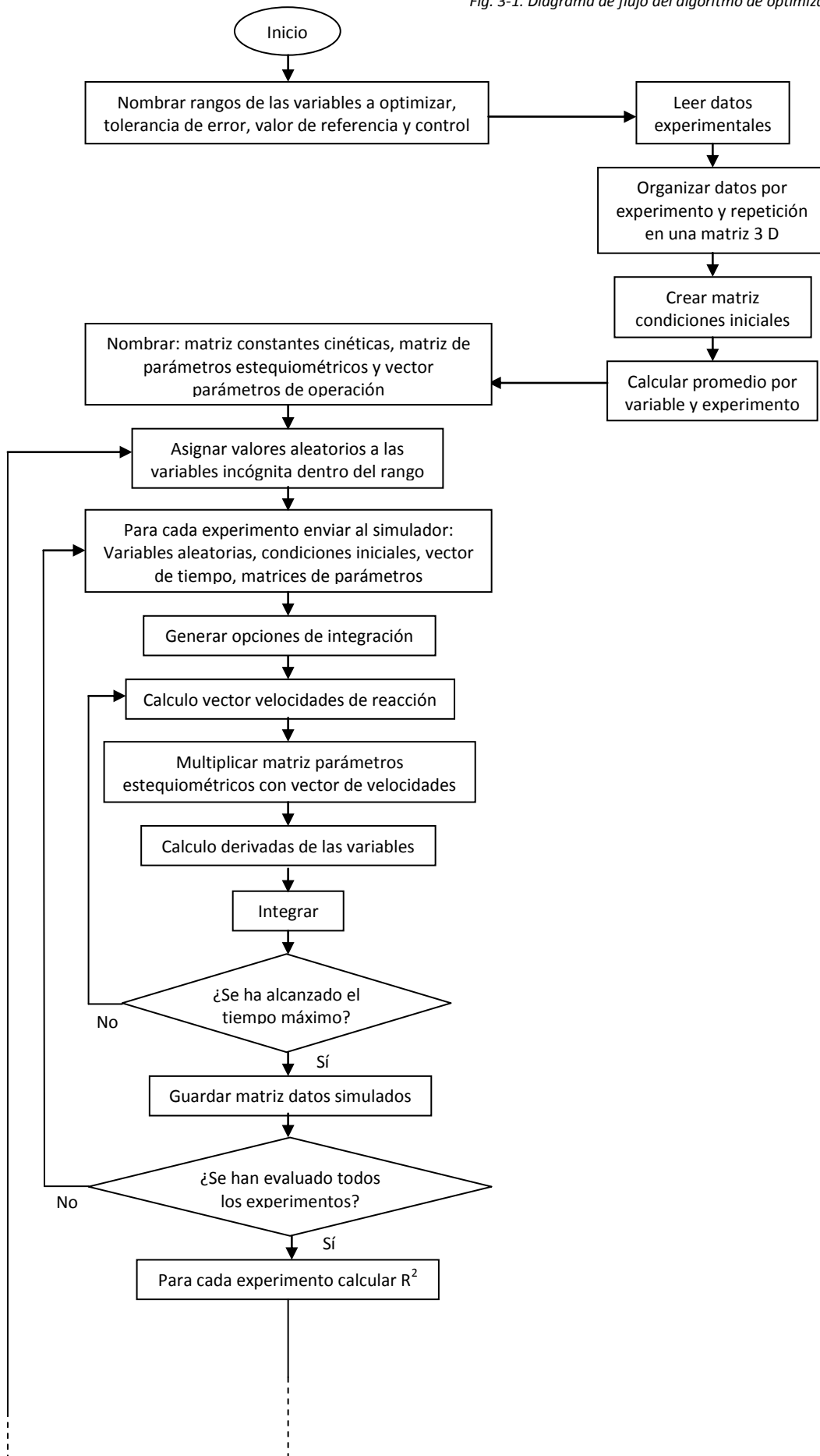
	X_{ac} (gDQO/L)	X_{sao} (gDQO/L)	X_{h2} (gDQO/L)	K_m sao (gDQO/gDQO-d)	K_s sao (gDQO/L)	K_m ac (gDQO/gDQO-d)	K_s ac (gDQO/L)	K_{iac} (molN/L)
Máximo	1	1	3	20	1	30	1	0.5
Mínimo	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	1	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$

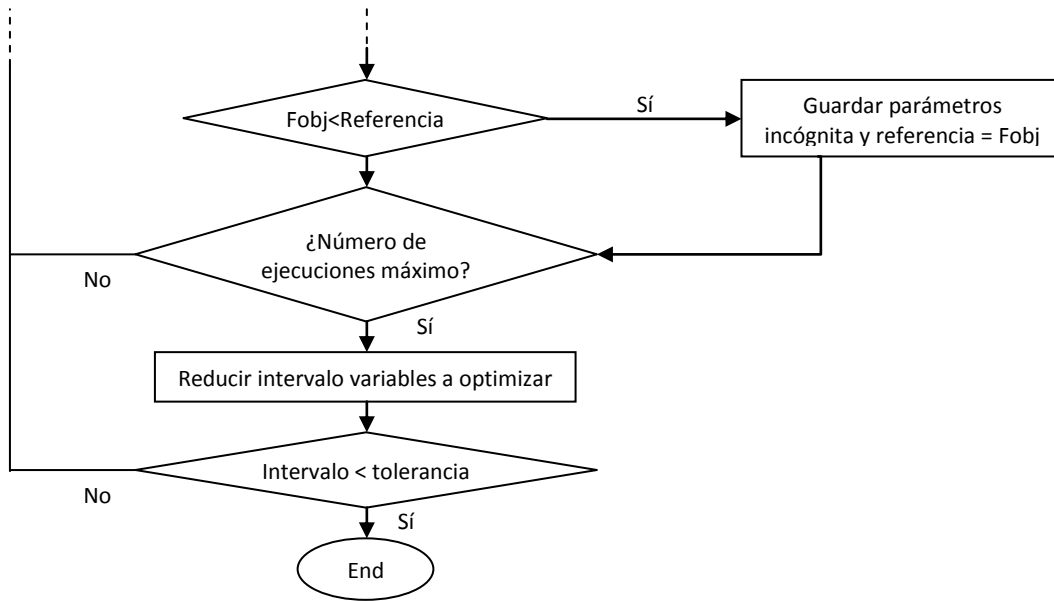
3.6 Ajuste datos ADM1 con estequiometría variable

Se realizó una simulación con ADM1 en régimen termofílico, y se guardaron los datos simulados.

Con el mismo método de Luus y Jaakola, (1973), y un modelo donde solo se implementó estequiometría variable en los organismos SAO, se intentó optimizar algunos parámetros (concentración inicial de SAO, e y K_s) para obtener el mismo resultado que el ADM1.

Fig. 3-1. Diagrama de flujo del algoritmo de optimización





4 Resultados y Discusión

4.1 Comparación ADM1 y estequiometria variable (EV)

4.1.1 PNdifT

En la Fig. 4-1 se presentan los resultados obtenidos de la simulación en ADM1 y EV con diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno inorgánico.

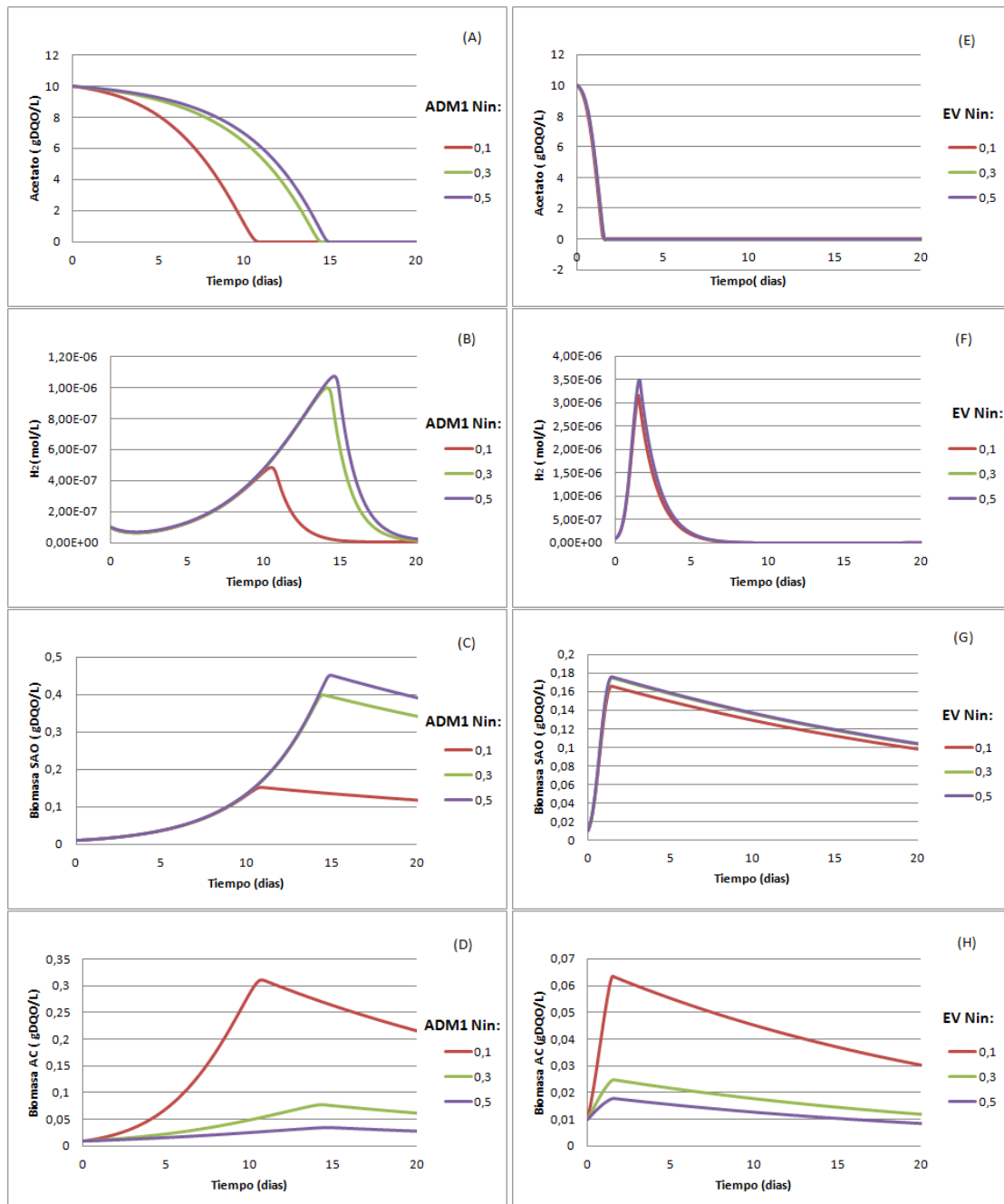


Fig. 4-1. Gráficos comparación ADM1 y EV. De la "A" a la "D" simulación ADM1, de la "E" a la "H" simulación con estequiometria variable. Diferentes curvas con distintas concentraciones de nitrógeno inorgánico (0,1; 0,3; 0,5 mol N/L)

En términos generales, podemos ver que ambas simulaciones presentan grandes diferencias entre ellas. La mayor causa de esta diferencia es el hecho de que en EV el crecimiento inicial tanto de SAO como de las bacterias acetoclásticas tiene una pendiente muy grande, tal y como se puede observar en el gráfico G y H. En el caso de SAO las condiciones son muy favorables termodinámicamente al inicio, ya que hay una presión baja de H_2 y una concentración alta de acetato. Por esta razón, el crecimiento de SAO es independiente del acetoclástico y no varía con las diferentes concentraciones de nitrógeno, como si lo hace en el ADM1. Pero como consecuencia de este crecimiento tan acelerado hay una producción elevada de H_2 y una disminución de acetato lo que produce que estas condiciones ya no sean exergónicas y deje de crecer. El acetato se consume mucho más deprisa que en ADM1, produciendo que los organismos acetoclásticos se desarrollen menos.

Pero que se agote antes el acético no es la única causa de que haya menos población acetoclástica, si se observan los organismos SAO también alcanzan valores inferiores. Esto es debido a la eficiencia de transferencia de electrones, que al ser de 0.45, disminuye mucho el crecimiento, produciendo que aunque haya un crecimiento muy acelerado, la población que alcanza es menor.

Según lo que se ha descrito de los organismos SAO, parece que obedece más a la realidad la simulación de ADM1, puesto que tienen más capacidad de crecer cuando las condiciones de crecimiento de los acetoclásticos se ven reducidas. Parece que debe haber más factores que influyan en el crecimiento que no se han tenido en cuenta.

4.1.1 PH2difT

En la Fig. 4-2 se pueden observar los gráficos obtenidos de la simulación en ADM1 y EV con diferentes concentraciones iniciales de arqueas hidrogenotróficas.

A diferencia de la anterior prueba, podemos observar que en EV el crecimiento está muy condicionado por la concentración de H_2 . Al contrario podemos ver que alcanzando concentraciones mayores de hidrógeno en caso del ADM1, el proceso sufre pocos cambios en el desarrollo de los SAO. Este hecho corroboraría el argumento de Rodríguez *et al.*, 2008, de que el ADM1, al no tener en cuenta la termodinámica del proceso, lleva a cabo reacciones que no sucederían en la realidad, porque son endorgónicas.

Además las concentraciones más altas de hidrógeno se alcanzan cuando el sustrato ha disminuido considerablemente debido a que se representa un sistema batch, por lo que aunque se pueda observar un cambio en el desarrollo dependiendo de la concentración de hidrógeno, esta inhibición debe ser más importante en un sistema continuo.

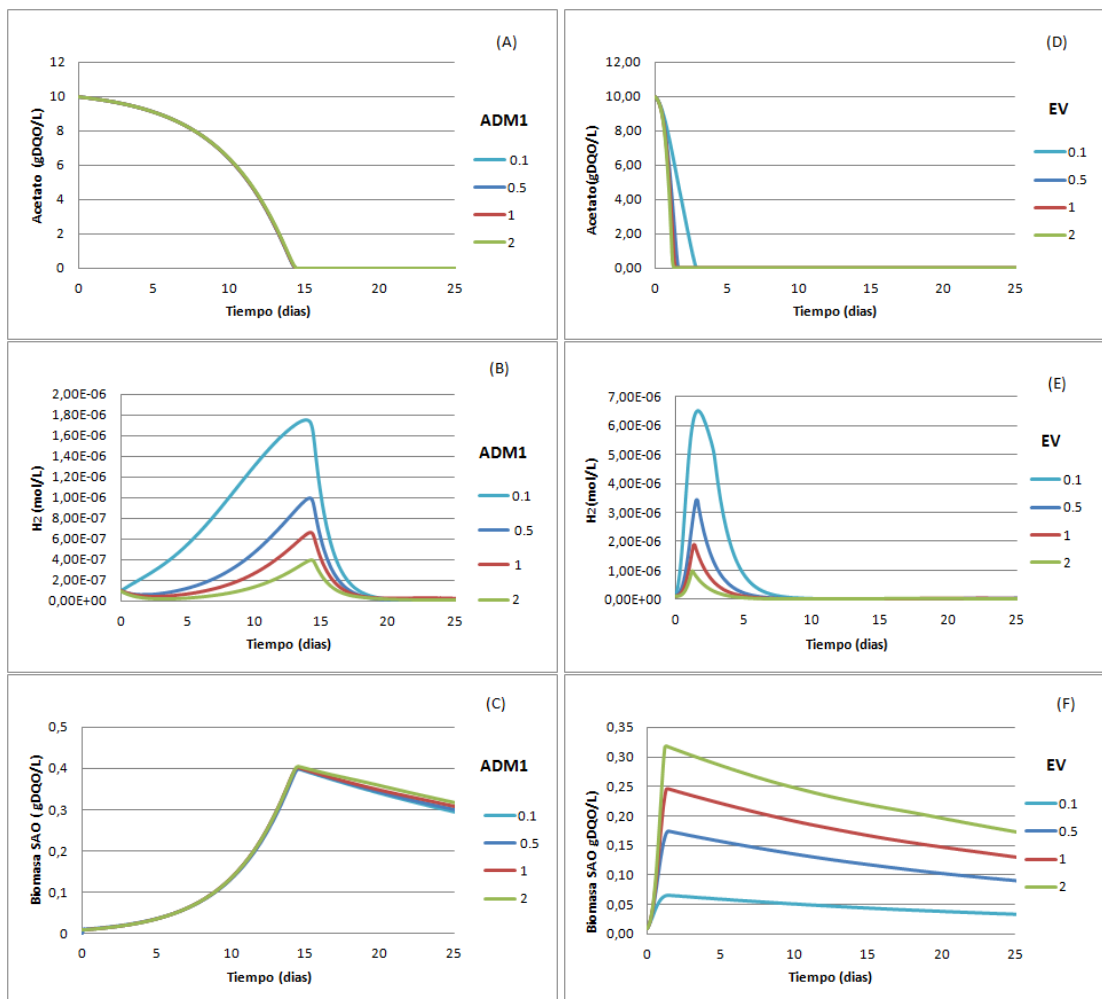


Fig. 4-2. Gráficos comparación ADM1 y EV. De la "A" a la "C" simulación ADM1, de la "D" a la "F" simulación con estequiometría variable. Diferentes curvas con distintas concentraciones iniciales de organismos hidrogenotrofos (X_{H_2})(0,1; 0,5; 1; 2 gDQO/L)

4.2 Diferencia entre régimen termofílico y mesofílico en EV

La temperatura tiene un gran efecto en la termodinámica, esto se refleja en las diferencias en la evolución del crecimiento de las poblaciones y la evolución del H₂ de la Fig. 4-3. En el mesofílico la velocidad de reacción de las poblaciones es más lenta, y la población alcanza valores inferiores; lo que provoca un consumo más lento del sustrato. El consumo de acético (A) ya no disminuye de forma casi lineal y se alarga más en el tiempo. Al igual que la evolución de hidrógeno (B), que es mucho más lenta que en termofílico, aunque alcanza valores similares.

El crecimiento de SAO (C) parece estar más afectado por la inhibición de H₂ que en termofílico, pues con una concentración inicial de hidrogenotrofos de 0,1 casi no crecen nada.

Si lo comparamos con ADM1, los parámetros cinéticos descritos Tabla 3-4 también son inferiores en régimen mesofílico y por lo tanto, los organismos también crecerán de forma más lenta.

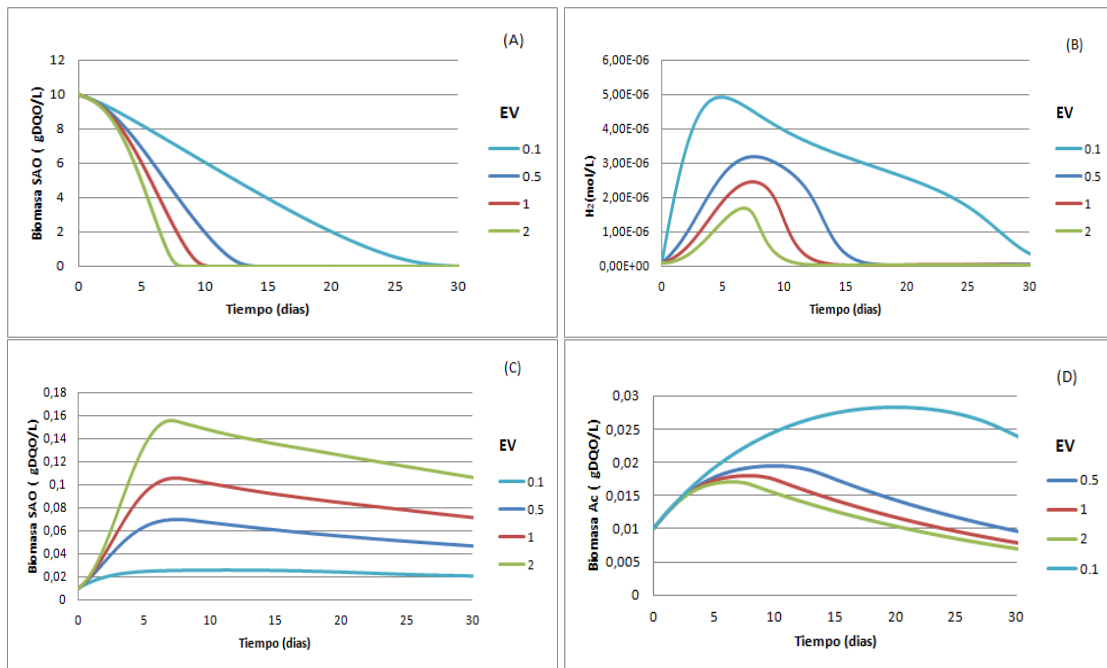


Fig. 4-3. Gráficos de EV en régimen mesofílico. Diferentes curvas con distintas concentraciones iniciales de organismos hidrogenotrofos (X_{h2}) (0,1; 0,5; 1; 2 gDQO/L)

4.3 Ajuste datos ADM1 a estequiometría variable

Las variables obtenidas, después de realizar la optimización de los datos producidos con ADM1, se pueden observar en la Tabla 4-1 y la simulación de ambos modelos relacionados en la Fig. 4-4.

Tabla 4-1. Parámetros obtenidos y valor de R²

X _{sao} (gDQO/L)	e	K _s (gDQO/L)	R ²
4,65E-05	0,202	0,714	0,992

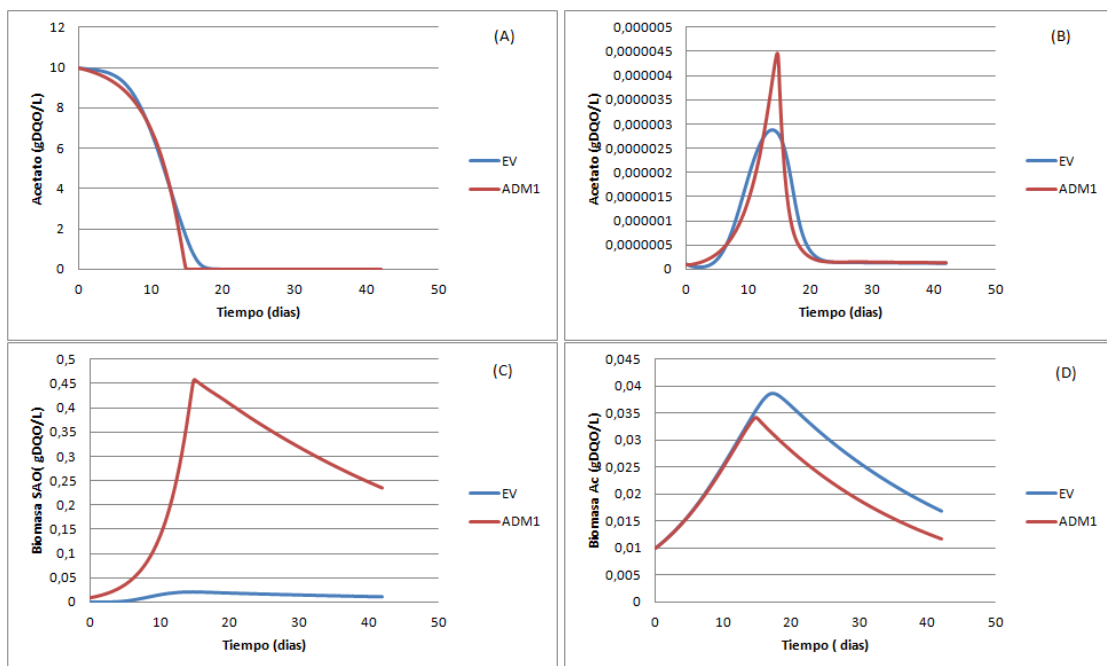


Fig. 4-4. Representación del ajuste de estequiometria variable a los datos obtenidos con ADM1.

Como se puede observar en las gráficas, para que haya una correlación entre ambas simulaciones, los microorganismos SAO en EV tienen un crecimiento mucho más bajo que en ADM1, una eficiencia de transferencia de electrones menor y una constante de saturación (K_s) mayor a las utilizadas en las comparaciones anteriores. Es lógico ya que como se ha observado en el apartado anterior, con EV el crecimiento de los microorganismos es mucho más acelerado y para que el consumo de acético sea proporcional entre ambos, requiere que su concentración inicial y crecimiento se vean reducidos

Una diferencia sutil entre ambas simulaciones, es su tendencia cuando se acaba el sustrato. Mientras que en ADM1 la concentración de microorganismos es tan alta que no disminuye su velocidad de consumo aunque se esté acabando el sustrato, en estequiometría variable, como podemos ver en el gráfico (A), la pendiente se suaviza disminuyendo la velocidad de consumo; tal y como se observa en los datos experimentales de Lü *et al.*, (2013), donde se observaron SAO. Esta tendencia también se puede observar en la Fig. 4-3.

4.4 Optimización de datos experimentales

Los valores de las incógnitas obtenidos después de la optimización se presentan en la Tabla 4-2. En la Fig. 4-5, 4-6 y 4-7 se puede observar la representación de los datos de experimentales de acetato, metano y hidrógeno respectivamente, junto con el ajuste realizado con el algoritmo de optimización *direct search*; y el coeficiente de regresión entre los datos experimentales y la simulación.

Tabla 4-2. Valores de las incógnitas.

X_{ac} (gDQO/L)	X_{sao} (gDQO/L)	X_{h_2} (gDQO/L)	$K_m\ sao$ (gDQO/gDQO·d)	$K_s\ sao$ (gDQO/L)	$K_m\ ac$ (gDQO/gDQO·d)	$K_s\ ac$ (gDQO/L)	K_{iac} (molN/L)
0,036	0,191	1,725	0,471	0,502	4,523	0,152	0,043

Los valores de los parámetros optimizados tienen un orden de magnitud comparable con aquellos que aparecen en el ADM1 y en la bibliografía. En la introducción se comentó que la μ_{max} de *C. ultunense*, el cual es mesofílico, es de 0,0347 - 0,0277 d^{-1} , si multiplicamos por la Y utilizada la $K_m\ sao$ obtenemos que el valor de μ_{max} es de 0,0251 d^{-1} , el cual es muy similar al argumentado anteriormente. Igual con la K_s que se encontró un valor de 0,503 en la bibliografía, y se ha obtenido un valor de 0,502.

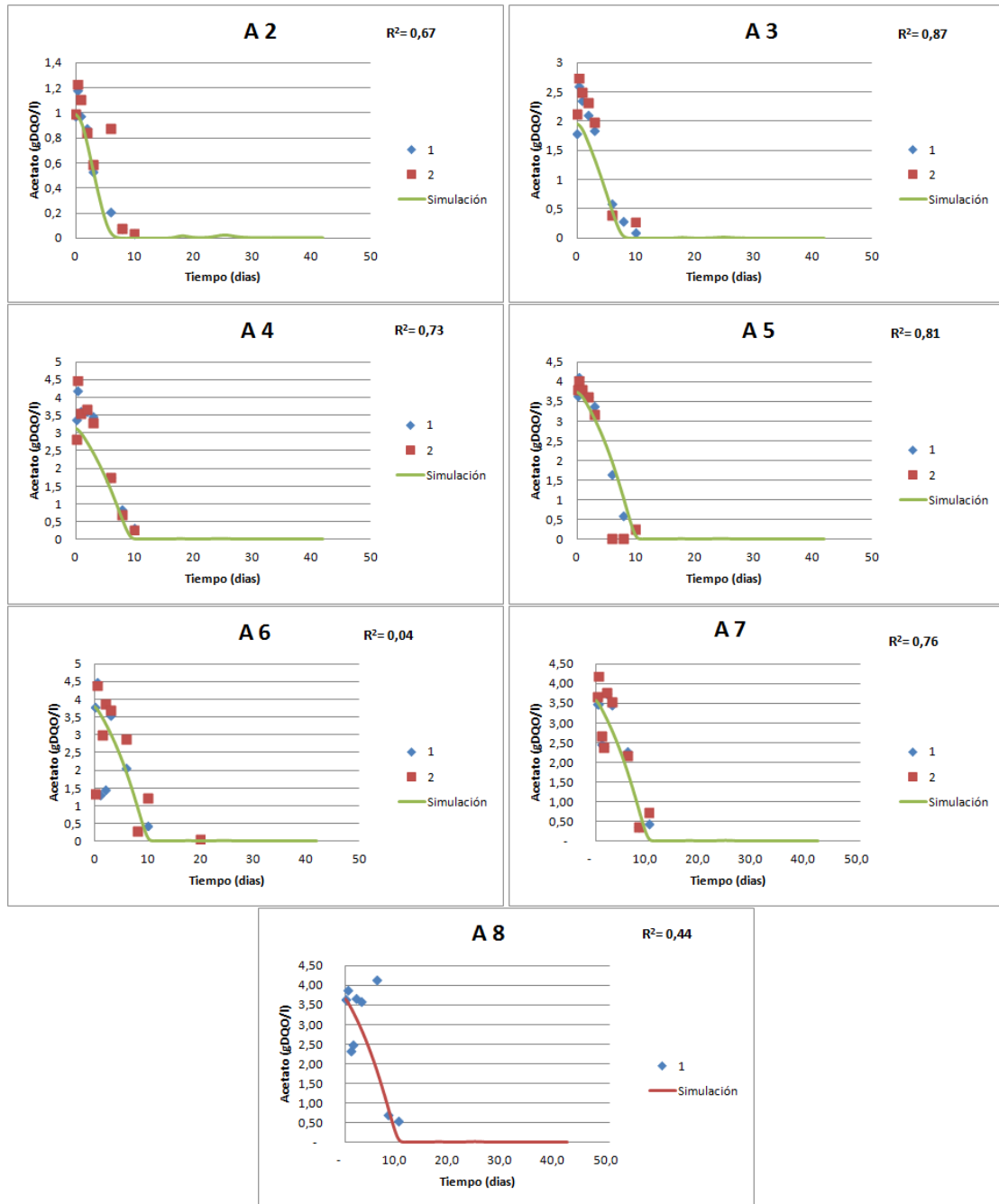


Fig. 4-5. Ajuste del modelo modificado de ADM1 a los datos experimentales de acetato. Cada uno corresponde al experimento que pone en su número.

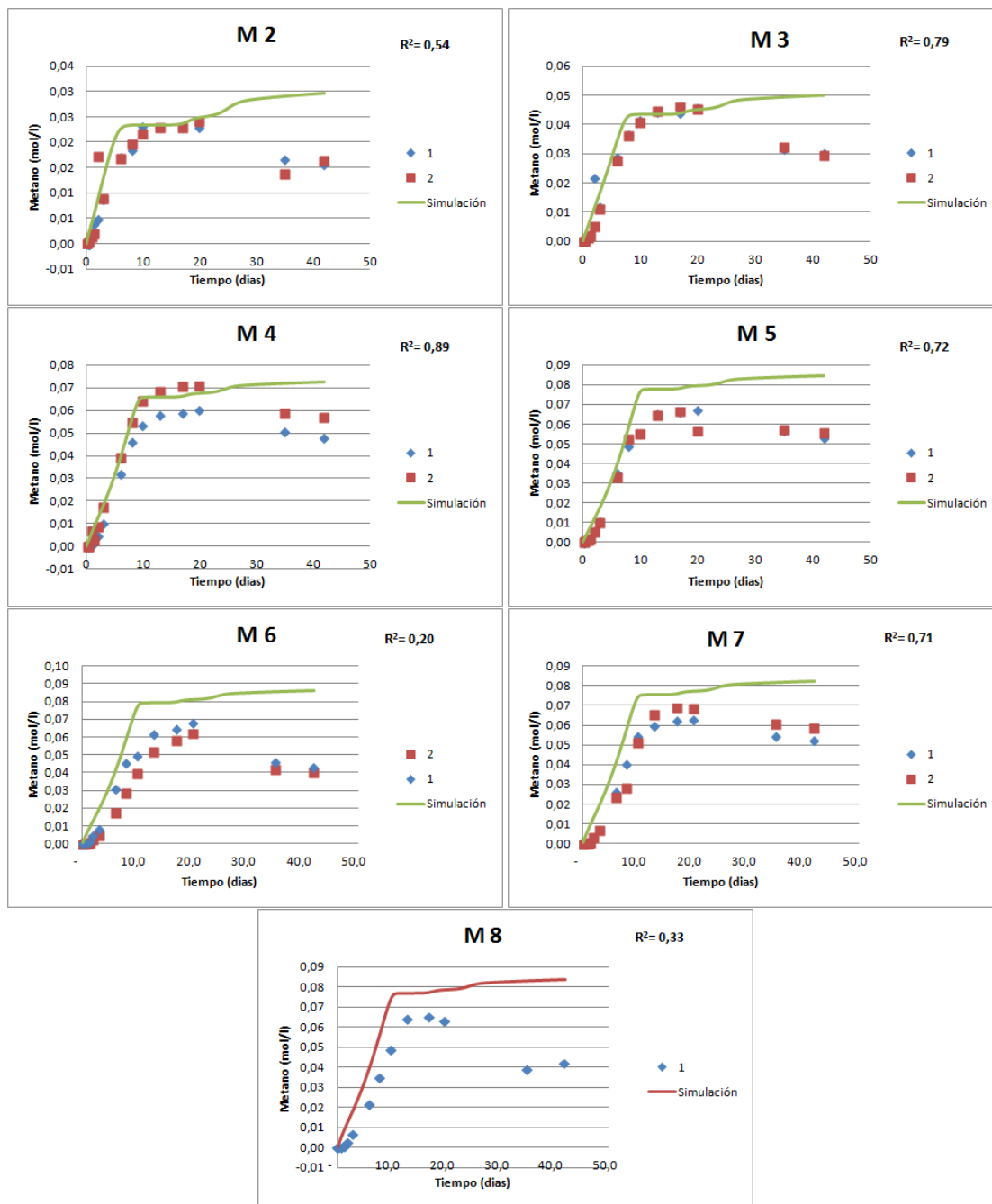


Fig. 4-6. Ajuste del modelo modificado de ADM1 a los datos experimentales de metano. Cada uno corresponde al experimento que pone en su número.

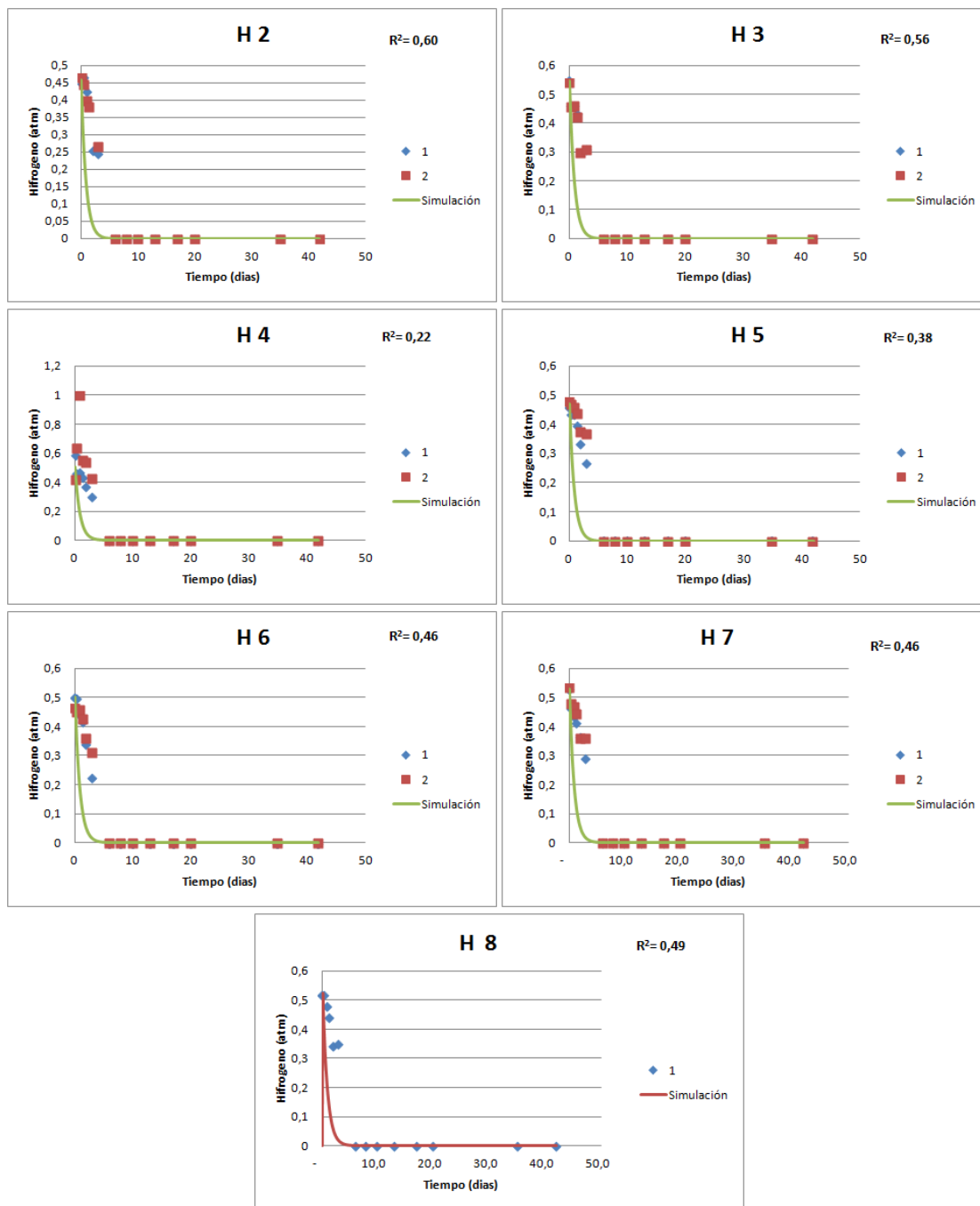


Fig. 4-7. Ajuste del modelo modificado de ADM1 a los datos experimentales de hidrógeno. Cada uno corresponde al experimento que pone en su número.

En cuanto a los gráficos, si observamos la evolución del ácido acético (Fig. 4-5), podemos ver que inicialmente hay una producción de acetato vinculada a la descomposición del inóculo. Como esta biomasa que se descompone es desconocida, el modelo no es capaz de simularla y disminuye la regresión.

En el caso del experimento 6 el modelo no consigue ajustarse a los datos, pues la nube de puntos no sigue ninguna tendencia y la evolución aumenta y disminuye.

Además en la mayoría de los datos se pueden observar valores que a simple vista están distanciados de la tendencia general y no son razonables experimentalmente. En la Fig. 4-8 se observa como varía la regresión del experimento 2, solo eliminando un dato que se consideró que estaba fuera de la tendencia pasó de tener una R^2 de 0,67 a 0,90.

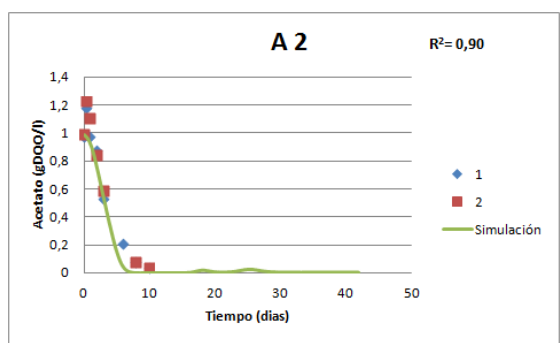


Fig. 4-8. Ajuste del modelo ADM1 a los datos experimentales de acetato del experimento 2, con el dato repetición 2, tiempo 5,8 eliminado.

Este hecho se puede ver además en las evoluciones del metano (Fig. 4-6), donde hay una disminución final, algo que solo puede ser debido a que haya habido pérdidas de este. A continuación se muestra el ejemplo de cómo mejora la regresión si se eliminan los datos finales de metano.

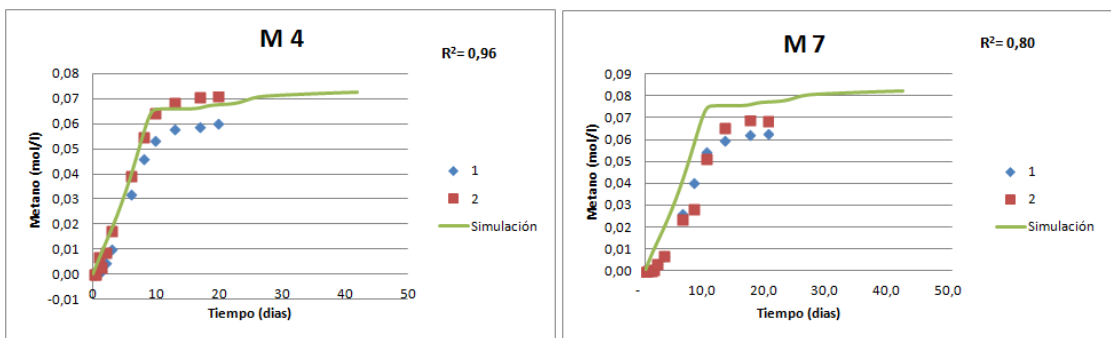


Fig. 4-9. Ajuste del modelo ADM1 a los datos experimentales de metano del experimento 4 y 7 con los dos últimos datos de cada repetición eliminados.

Para mejorar el ajuste sería necesario utilizar unos datos con un inóculo menos contaminado, sometido a un proceso de filtrado por ejemplo, y realizar un análisis de valores atípicos o *outliers* y así reducir los errores experimentales que distorsionan el ajuste.

En el experimento 5, podemos ver que la pendiente inicial coincide con la simulación, pero la simulación alcanza valores de producción de metano superiores. El experimento 6, podemos ver que otra vez no se ajusta demasiado a la simulación, pero la tendencia inicial sigue la tendencia correcta. Finalmente los experimentos 7 y 8, podemos ver que se distancian un poco más de la pendiente inicial que los anteriores, y al igual que el 5 alcanzan un valor máximo de producción menor.

Lü *et al.*, (2013) obtuvieron unos resultados parecidos, calcularon la cantidad de biomasa que no se les transformó en metano y esta para los experimentos más desfavorables rondaba el 10 % de la biomasa inicial. Ellos argumentaron que los SAO acumulan productos microbianos solubles en condiciones de estrés. Este hecho podría ser la causa de que para los experimentos argumentados anteriormente se haya obtenido una concentración de metano inferior a la simulada.

En cuanto a la evolución de hidrógeno, podemos observar que en la simulación se consume más deprisa que en los datos experimentales, esto puede ser debido a que la concentración de microorganismos obtenida es demasiado elevada o porque los parámetros cinéticos establecidos del ADM1, no son adecuados.

Finalmente, en cuanto a las evoluciones de las poblaciones, este resultado confirma la hipótesis de que este inóculo contenía microorganismos SAO, ya que provenía de un reactor con un alto contenido amoniacal. Estos al no estar favorecidos por una alta concentración de nitrógeno, empiezan a disminuir, algo esperado. En cuanto a los organismos acetoclásticos, se esperaba que su concentración fuera baja, ya que del reactor que provenía estaban inhibidos, pero al disminuir la concentración de nitrógeno, se ven favorecidos.

Se puede observar además que a medida que aumenta la concentración inicial de acetato, las poblaciones tienen un crecimiento mayor, pero cuando este ya es más o menos constante, y aumenta el nitrógeno, podemos ver una ligera inhibición en los acetoclásticos y un aun más ligero incremento de los SAO.

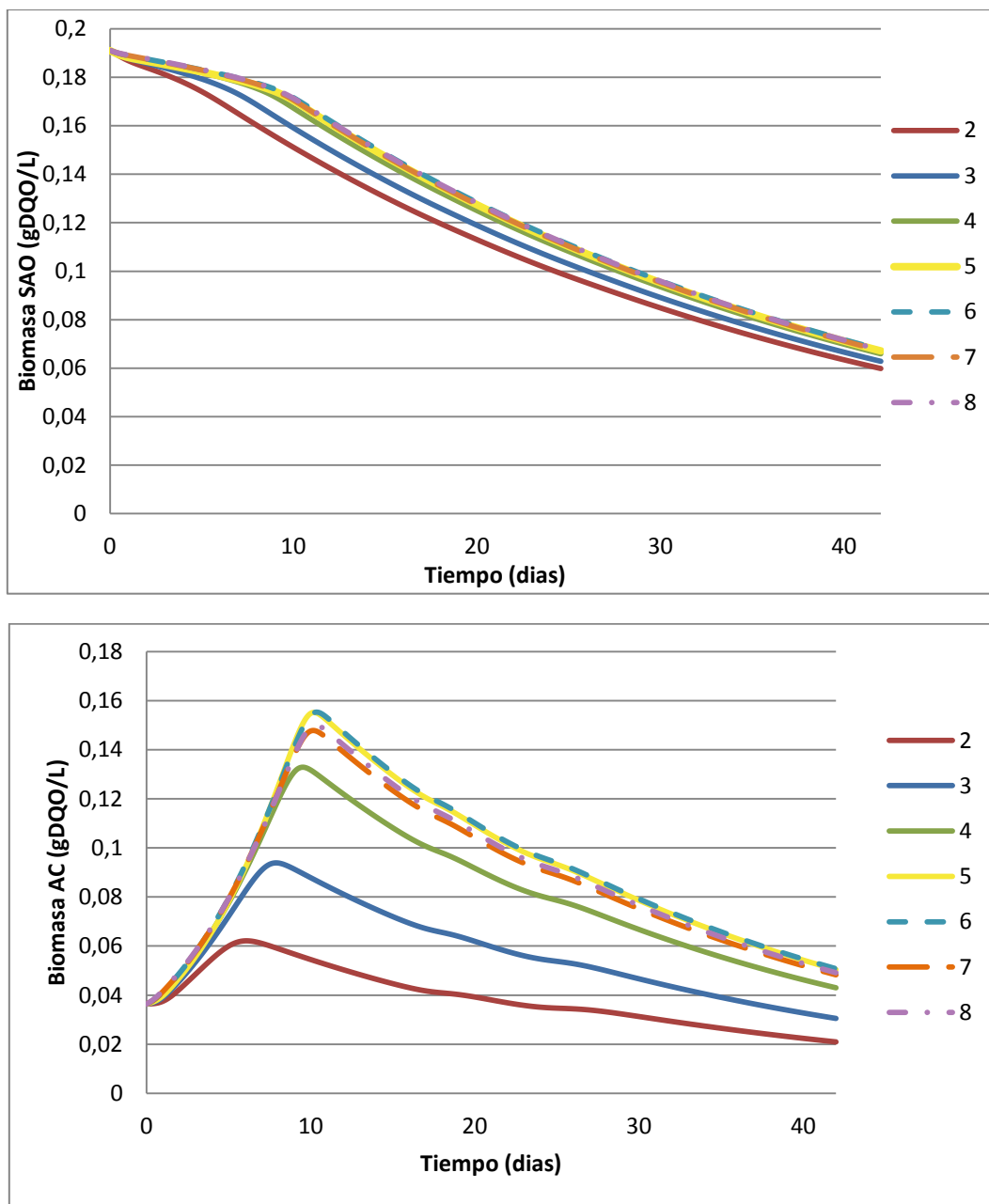


Fig. 4-10. Simulación de la evolución de las poblaciones SAO y acetoclástica en los diferentes experimentos.

5 Conclusiones

La estequiometría variable parece ser necesaria para explicar inhibiciones causadas por la termodinámica de la reacción que el organismo lleva a cabo, como es el caso del hidrógeno para los organismos SAO. Pero por el contrario, parece que debe haber algún otro factor que condicione la velocidad de crecimiento, pues esta parece ser muy acelerada cuando las condiciones son favorables, pero aunque la velocidad sea alta, por el efecto de la eficiencia de transferencia de electrones, las concentraciones de microorganismos que se alcanzan son más bajas para obtener el mismo consumo que el ADM1. Para conocer qué modelo se aproxima más a la realidad habría que medir no solo la concentración de substrato, también la concentración de microorganismos. Además se ha constatado el hecho de que la inhibición de ADM1 para el hidrógeno, no respeta la segunda ley de la termodinámica.

En cuanto al ajuste del modelo a los datos experimentales, con los datos obtenidos, se ha confirmado la hipótesis de la existencia de bacterias SAO en el inóculo inicial. Además se ha dado la dinámica esperada, en la que los organismos SAO al no estar favorecidos, disminuyen en concentración, por lo que el modelo ha cumplido con el objetivo de ayudar al conocimiento del proceso. Además se han obtenido unos parámetros cinéticos muy próximos a los encontrados en la bibliografía. Por lo tanto, se cree que podría ser muy importante tener en cuenta estos microorganismos cuando se trate de estudiar un reactor con una alta concentración de amonio, así como, su inclusión en el modelo ADM1, según lo realizado en el presente trabajo.

Posibles trabajos de futuro adicionales que se proponen, para una mayor profundización de la dinámica de los microorganismos SAO, son:

- Realizar ajuste de datos experimentales con estequiometría variable. A ser posible intentar obtener datos sobre la concentración de organismos, con el fin de poder comprobar qué modelo se ajusta mejor.
- Estudiar si los parámetros cinéticos de los hidrogenotróficos de ADM1 utilizados en el ajuste son correctos y como afecta al resto de parámetros que se les considere incógnita.
- Realizar el ajuste con datos donde las condiciones de crecimiento para los microorganismos SAO estén favorecidas.

6 Bibliografía

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. Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T., Siegrist, H., Vavilin, V.A., 2002. Anaerobic Digestion Model No. 1. (ADM1). Iwa Task Group, IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes, *IWA Publishing*, London.
3. Campos, E., 2001. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Tesis doctoral, Universitat de Lleida.
4. Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99:4044–4064
5. Donoso-Bravo, A., Mailier, J., Martin, C., Rodríguez, J., Aceves-Lara, C. A., Wouwer, A. V., 2011. Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A . review. *Water research*, 45: 5347- 5364.
6. Flotats, X., 2014. Dinámica de la Digestión anaerobia. En Solera, R. (Ed), Aspectos biológicos de la digestión anaerobia. Editorial Paraninfo, Madrid (en prensa).
7. Flotats, X., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 2003. Parameter Identification of Thermophilic Anaerobic Degradation of Valerate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 109: 47-62.
8. Flotats, X., Campos, E., 2005. Procesos biológicos. La digestión anaerobia y el compostaje. En: editado por: Elías, X. (eds) Tratamiento y valorización energética de residuos. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. Pp. 618-686.
9. Flotats, X., Palatsi, J., Ahring, B.K., Angelidaki, I., 2006. Identifiability study of the proteins degradation model, based on ADM1, using simultaneous batch experiments. *Water Science & Technology*, 54: 31–39
10. Garcia, J., 2014. Characterization of a mesophilic anaerobic inoculum by means of methanogenic activity tests. Trabajo final de grado. Ingeniería de Sistemas Biológicos, ESAB, Universitat Politècnica de Catalunya.
11. Hattori, S., 2008. Syntrophic Acetate-Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments. *Microbes Environ.*, 23:118–127.
12. Hattori, S., Galushko, A.S., Kamagata, Y., Schink, B., 2005. Operation of the CO

- dehydrogenase/acetyl coenzyme A pathway in both acetate oxidation and acetate formation by the syntrophically acetate-oxidizing bacterium *Thermacetogenium phaeum*. *J. Bacteriol.*, 187:3471–3476.
13. Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S., Shoun, H., 2000. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50:1601–1609.
 14. Hattori, S., Luo, H., Shoun, H., Kamagata, Y., 2001. Involvement of formate as an interspecies electron carrier in a syntrophic acetate-oxidizing anaerobic microorganism in coculture with methanogens. *J. Biosci. Bioeng.*, 91:294–298
 15. Lee, M.J., Zinder, S.H., 1988. Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H₂-CO₂. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:124–129.
 16. Lü, F., Hao, L., Guan, D., Qi, Y., Shao, L., He, P., 2013. Synergetic stress of acids and ammonium on the shift in the methanogenic pathways during thermophilic anaerobic digestion of organics. *Water research*. 47: 2297 – 2306.
 17. Luus, R., Jaakola, T. H. I., 1973. Optimization by direct search and systematic reduction of the size of search region. *AIChE Journal*, 19: 760–766
 18. Moles, C.G., Mendes, P., Banga, J.R., 2003. Parameter Estimation in Biochemical Pathways: A Comparison of Global Optimization Methods. *Genome Res.*, 13: 2467-2474.
 19. Oehler, D., Poehlein, A., Leimbach, A., Müller, N., Daniel, R., Gottschalk, G., Schink, B. 2012. Genome-guided analysis of physiological and morphological traits of the fermentative acetate oxidizer *Thermacetogenium phaeum*. *BMC Genomics*, 13:723
 20. Penumathsa, B.K.V., Premier, G.C., Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A.J., Sandra Esteves, S., Rodríguez, J., (2008). ADM1 can be applied to continuous bio-hydrogen production using a variable stoichiometry approach. *Water research*. 42:4379-4385.
 21. Rodríguez, J., Lema, J. M., Kleerebezem, R., 2008. Energy-based models for environmental biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26: 336-374.
 22. Schnürer, A., Schink, B., Svensson, B.H., 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46:1145–1152.
 23. Schnürer, A., Svensson, B.H., Schink, B., 1997. Enzyme activities in and energetics of acetate metabolism by the mesophilic syntrophically acetate-oxidizing anaerobe *Clostridium ultunense*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 154:331–336

24. Zinder, S. H. 1993. Phyliological ecology of methanogens. En: editado por: Ferry, J. G. (eds.). Methanogenesis. 128- 206.

Anexos

1. Algoritmo de optimización utilizado.

El algoritmo principal Dsearch:

```

clear all
RImax(1)=1;           %Xac
RImin(1)=1e-4;
RImax(2)=1;           %Xsao
RImin(2)= 1e-4;
RImax(3)=3;           %XH2
RImin(3)=1e-3;
RImax(4)=20;          %kmsao
RImin(4)=1e-3;
RImax(5)=1;           %Kssao
RImin(5)=1e-4;
RImax(6)=30;          %KmAc
RImin(6)=1;
RImax(7)=1;           %KsAc
RImin(7)=1e-4;
RImax(8)=0.1;         %KIac
RImin(8)=1e-4;

ref=10000000;
[MMM,Vp]=TransExp();
[ProExp,MOM]=R2(MMM,Vp);
NCONTROL=0;
Rtol(1)=1e-3;         %tolerancia Incognita 1
Rtol(2)=1e-3;         %tolerancia Incognita 2
Rtol(3)=1e-3;
Rtol(4)=1e-3;
Rtol(5)=1e-3;
Rtol(6)=1e-3;
Rtol(7)=1e-3;
Rtol(8)=1e-3;
Rtol(9)=1e-3;
Rtol(10)=1e-3;
NR= Vp(1,4);          %numero de repeticiones totales
NumV=Vp(2,4)-1;      %numero de variables
ENF2=Vp(:,1:3);
TM=max(ENF2(:,3));   %numero de filas maximo en la matriz MMM
MD=zeros(TM,NumV,NR);
[KK,KO]=genKK();
MM=genMM;
Lr=length(RImax);
while NCONTROL < 7
    disp('On Direct')
    for j=1:500%3000
        RI(1)=rand*(RImax(1)-RImin(1))+RImin(1);
        RI(2)=rand*(RImax(2)-RImin(2))+RImin(2);
        RI(3)=rand*(RImax(3)-RImin(3))+RImin(3);
        RI(4)=rand*(RImax(4)-RImin(4))+RImin(4);
        RI(5)=rand*(RImax(5)-RImin(5))+RImin(5);
        RI(6)=rand*(RImax(6)-RImin(6))+RImin(6);
        RI(7)=rand*(RImax(7)-RImin(7))+RImin(7);
        RI(8)=rand*(RImax(8)-RImin(8))+RImin(8);
    end
end

```

```

for k=1:NR
    INI=MOM(:, :, k);
    for d=1:(ENF2(k,3))
        TIME(d)=MMM(d,1,k);
    end
    Prec=mainadm1(RI, INI, TIME, MM, KK, KO);
    for d=1:(ENF2(k,3))
        MD(d, :, k)=Prec(d, :);
    end
    TIME=zeros(1,3);
    Prec=zeros(1,3);
end
Fobj=zeros(NR, NumV);
FOBJt=0;

for a=1:NR
    for b=1:NumV
        for c=1:(ENF2(a,3))
            if MMM(c,b,a) > 0
                Fobj(a,b) = Fobj(a,b) + (MMM(c,b,a) - MD(c,b,a))^2;
            end
        end
        FOBJt = FOBJt + Fobj(a,b)/ProExp(a,b);
    end
end

if FOBJt < ref
    ref=FOBJt;
    jref=Fobj;
    MDref=MD;
    for b = 1 : Lr
        RIref(b)=RI(b);
    end
    xlswrite('RIref', ref(:, :), 1);
    xlswrite('RIref', RIref(:, :), 2);
end
end
ref

for i=1:Lr
    Rinter(i) = RImax(i) - RImin(i);
    Rinter(i) = Rinter(i) * 0.9867543671;

    if (RIref(i) - (Rinter(i)/2)) > RImin(i)
        RImin(i) = RImax(i) - Rinter(i);
    end
    if (RIref(i) + (Rinter(i)/2)) < RImax(i)
        RImax(i) = RImin(i) + Rinter(i);
    end
end
for j=1:Lr
    if (Rinter(i)/2) < Rtol(i)
        NCONTROL = NCONTROL + 1;
    end
end
end
end

```

2. Algoritmo que realiza las derivadas en estequiometría variable

```
function F=fadmn1bx(t,U,KK,KO,MM,U0)

%Operating parameters of the system
R= KO(1);      %bar.m3/kmol.K  R   Constant universal of perfect gases
zc=KO(2);      %K             zc  Constant for change of °C to K
Pa=KO(3);      %bar           Pa  Atmospheric pressure exterior to
reactor
T= KO(4);      %K             T   Temperature of the reactor
Vg=KO(5);      %m3           Vg  Volume of the gaseous phase
Vl=KO(6);      %m3           Vl  Volume of the liquid phase
Q= KO(7);      %m3/d         Q   influent and effluent flow rate for
CSTR reactor
Kp=KO(8);      %m3/d.bar      Kp  Coefficient of the gas escape valve
kla=KO(9);     %d-1          kla Coefficient of the liq-gas mass
transfer
AGrs=12.467;   %KJ/éeq       Enegia de Gibbs de reacción estandar
AGds=-27.403;  %KJ/éeq       Enegia de Gibbs del donador
estandar
AGpc = 18.8;   %KJ/éeq       Enegia de Gibbs de piruvato estandar
AGrsH=-16.34; %KJ/éeq       Enegia de Gibbs de reacción
estandar
AGdsH=-39.87; %KJ/éeq       Enegia de Gibbs del donador
estandar
AGrsa=-3.874;
e=0.45;

%Determination of Henry coefficients pressure vapour. (Table 4.2,
equation 4.10)
KHh2= 7.8e-4*exp( -4180/8.324*(1/298-1/T)); %kmol/m3.bar
Henry's coef. for H2
KHch4=1.4e-3*exp(-14240/8.324*(1/298-1/T)); %kmol/m3.bar
Henry's coef. for CH4
KHco2=3.5e-2*exp(-19410/8.324*(1/298-1/T)); %kmol/m3.bar
Henry's coef. for CO2

Pv=0.0313*exp(5290*(1/298-1/T)); %bar      Water
vapor pressure

%Determination of equilibrium constants of the ionic dissociation
(Table 4.1 + eq. 4.10)
pkw=14.0-55900/8.324*(1/298-1/T)*log10(exp(1)); %H2O <====> OH- +
H+
pkn=9.25-51965/8.324*(1/298-1/T)*log10(exp(1)); %NH4+ <====> NH3 +
H+
pkc=6.35- 7646/8.324*(1/298-1/T)*log10(exp(1)); %CO2 + H2O <====>
HCO3- + H+
pkac=4.81; %Value at 333K %AcH <====> Ac- +
H+
pkpr=4.94; %Value at 333K %PrH <====> Pr- +
H+
pkbu=4.92; %Value at 333K %BuH <====> Bu- +
H+
pkva=4.86; %Value at 298K %VaH <====> Va- +
H+

%Concentration of the volatile forms of CO2 and NH3
```

```

x=U(28); %this is the pH, written as x for
easy
co2=U(10)/(1+10^(x-pkc)); %kmol/m3 Conc. CO2 in the liquid
nh3=U(11)/(1+10^(pkn-x)); %kmol/m3 Conc. NH3 in the liquid

%pH Inhibition functions-----
-----
Iph5=1; Iph11=1; Iph12=1; Iph20=1;
if x<KK(5,4) Iph5= exp(-3*((x- KK(5,4))/(KK(5,4)-KK(5,3)))^2);
end
if x<KK(11,4) Iph11=exp(-3*((x- KK(11,4))/(KK(11,4)-KK(11,3)))^2);
end
if x<KK(12,4) Iph12=exp(-3*((x- KK(12,4))/(KK(12,4)-KK(12,3)))^2);
end
if x<KK(20,4) Iph20=exp(-3*((x- KK(20,4))/(KK(20,4)-KK(20,3)))^2);
end

%Reaction rates (kgCOD/d.m3)-----
-----
P(1)=KK(1,1)*U(13);
P(2)=KK(2,1)*U(14);
P(3)=KK(3,1)*U(15);
P(4)=KK(4,1)*U(16);
P(5)=KK(5,1)*U(1)*U(17)/(KK(5,2)+U(1))*Iph5*U(11)/(KK(5,5)+U(11));
P(6)=KK(6,1)*U(2)*U(18)/(KK(6,2)+U(2))*Iph5*U(11)/(KK(6,5)+U(11));

P(7)=KK(7,1)*U(3)*U(19)/(KK(7,2)+U(3))*Iph5*U(11)/(KK(7,5)+U(11))*KK(7,6)/(KK(7,6)+U(8));

P(8)=KK(8,1)*U(4)*U(20)/(KK(8,2)+U(4))*Iph5*U(11)/(KK(8,5)+U(11))*KK(8,6)/(KK(8,6)+U(8))*U(4)/(U(4)+U(5));

P(9)=KK(9,1)*U(5)*U(20)/(KK(9,2)+U(5))*Iph5*U(11)/(KK(9,5)+U(11))*KK(9,6)/(KK(9,6)+U(8))*U(5)/(U(4)+U(5));

P(10)=KK(10,1)*U(6)*U(21)/(KK(10,2)+U(6))*Iph5*U(11)/(KK(10,5)+U(11))*KK(10,6)/(KK(10,6)+U(8));
% Calculo concentración molar-----

CO2= R*T*U(33); % mol/l
HCO3= U(10)/(1+10^(-x+pkc)); % mol/l
AC= U(7)/(8*8); % mol/l AC
H2= U(31)*R*T; % % mol/l H2
CH4=U(32)*R*T; %mol/l CH4

% Calculo de Km mediante AG para Acetoclasticos
-----

if AC>0 && H2>0 && CO2>0 && HCO3>0
LOGDa=log(((CO2^(1/8))*(HCO3^(1/8)))/(AC^(1/8)));
LOGRa=log(((HCO3^(1/8))*(CH4^(1/8)))/(AC^(1/8)));
AGda = AGds+ ((8.341e-3)*T*LOGDa);
AGra=AGrsa+(LOGRa*T*0.008341);
if AGra>0
AGra=-0.0000000001;
end

AGpa=30.9+AGda;

```

```

if AGpa<0
    na = -1;
else
    na=1;
end

AGsa= (AGpa/e^na)+(AGpc/e);
Aa=-AGsa/(e*AGra);
fsa=1/(Aa+1);
fea=1-fsa;
yac=fsa;

MM(11,7)=-1;
MM(11,9)=1-yac;
MM(11,11)=-yac*2/(5*64);
MM(11,22)=yac;
MM(11,10)=(1-yac)/64;

qa=(1/fea)*(1.07^(T-293));

muac=yac*113*qa/20;

KK(11,1)=muac/yac;

P(11)=KK(11,1)*U(22)*(U(7)/(KK(11,2)+U(7)))*IpH11*(KK(11,7)/(KK(11,7)+
nh3));

else
    P(11)=0;
end
% Calculo de Km mediante AG para hidrogenotrofos
if AC>0 && H2>0 && CO2>0 && HCO3>0 && CH4 >0

LOGDH=log(1/(H2^(1/2)));
LOGRH=log((CH4^(1/8))/((H2^(1/2))*(CO2^(1/8))));
AGdH = AGdsH+ ((8.314e-3)*T*LOGDH);
AGrH=AGrsH+(LOGRH*T*0.008314);
AGpH=30.9+AGdH;

if AGpH<0
    n = -1;
else
    n=1;
end

AGsH= (AGpH/e^n)+(AGpc/e);
AH=-AGsH/(e*AGrH);
fsH=1/(AH+1);
feH=1-fsH;
yH=fsH;

MM(12,8)=-1;
MM(12,9)=1-yH;
MM(12,11)=-yH/(10*16);

```



```

MM(12,23)=yH;
MM(12,10)=- (5+7*yH) / (20*2*8);

qH=(1/feH) * (1.07^(T-293));

muH=yH*113*qH/20;

KK(12,1) =muH/yH;

P(12)=KK(12,1) *U(8) *U(23) / (KK(12,2) +U(8) ) *IpH12;
else
P(12)=0;
end

%Calcular km mediante AG SAO

if AC>0 && H2>0 && CO2>0 && HCO3>0

LOGD=log( (((CO2^(1/8)) * (HCO3^(1/8))) / (AC^(1/8)))));
LOGR=log( (((CO2^(1/8)) * (HCO3^(1/8)) * (H2^(1/2))) / (AC^(1/8)))));
AGd = AGds+ ((8.314e-3) *T*LOGD);
AGr=AGrs+(LOGR*T*0.008314);

if AGr>0
    AGr=-0.0000000001;
end

AGp=30.9+AGd;

if AGp<0
    n = -1;
else
    n=1;
end

AGs= (AGp/e^n) + (AGpc/e);
A=-AGs/(e*AGr);
fs=1/(A+1);
fe=1-fs;
ysao=fs;

MM(20,7) = -1;
MM(20,8) = 1-ysao;
MM(20,11)=- (2*ysao) / (5*8*8);
MM(20,25)=ysao;
MM(20,10)=(10-(10*ysao)) / (5*8*8);

q=(1/fe) * (1.07^(T-293));

mu=ysao*113*q/20;

KK(20,1) =mu/ysao;
P(20)=KK(20,1) *U(25) *IpH20* (U(7) / (KK(20,2) +U(7))) );

else

```

```

P(20)=0;
end
%.....

P(13)=KK(13,1)*U(17);
P(14)=KK(14,1)*U(18);
P(15)=KK(15,1)*U(19);
P(16)=KK(16,1)*U(20);
P(17)=KK(17,1)*U(21);
P(18)=KK(18,1)*U(22);
P(19)=KK(19,1)*U(23);
P(21)=KK(21,1)*U(25);

P=P' ;           % P(22,1) Vector column

%Liquid-gas mass transfer rates
rTh2= kla*(U(8)/16-KHh2 *U(31)*R*T);           %kmol/m3.d      Transf. liq-
gas h2
rTch4=kla*(U(9)/64-KHch4*U(32)*R*T);           %kmol/m3.d      Transf. liq-
gas ch4
rTco2=kla*(co2      -KHco2*U(33)*R*T);           %kmol/m3.d      Transf. liq-
gas co2

%Reaction term vector.  RR: colum vector of the reaction terms
RR=zeros(29,1); %Positions 25 and 26 are zeros. Corresponding to Scat
and
RR(1:25,1)=MM'*P;           %kg COD/m3.d (except 10 and 11 that are
kmol/m3.d)

RR(8)=RR(8)-16*rTh2; %kg COD/m3.d  Inclusion of the liq-gas transfer
RR(9)=RR(9)-64*rTch4; %kg COD/m3.d  Inclusion of the liq-gas transfer
RR(10)=RR(10)-rTco2; %kmol/m3.d    Inclusion of the liq-gas transfer

%Derivatives evaluation for all components in solution
F=Q/Vl*(U0-U(1:27))+RR(1:27);           %F(i)=... (i=1,...,26)

%Derivative evaluation for pH as pseudostatevariable
F(28)=(F(26)-F(27)+F(11)/(1+10^(x-pkn))-F(10)/(1+10^(pkc-x))...
-F(4)/208/(1+10^(pkva-x))-F(5)/160/(1+10^(pkbu-x))...
-F(6)/112/(1+10^(pkpr-x))-F(7)/64/(1+10^(pkac-x)))/...
log(10)/(10^-x+10^(x-pkw))...
+10^(x-pkn)/(1+10^(x-pkn))*U(11)/(1+10^(x-pkn))...
+10^(pkc-x)/(1+10^(pkc-x))*U(10)/(1+10^(pkc-x))...
+10^(pkva-x)/(1+10^(pkva-x))*U(4)/208/(1+10^(pkva-x))...
+10^(pkbu-x)/(1+10^(pkbu-x))*U(5)/160/(1+10^(pkbu-x))...
+10^(pkpr-x)/(1+10^(pkpr-x))*U(6)/112/(1+10^(pkpr-x))...
+10^(pkac-x)/(1+10^(pkac-x))*U(7)/64/(1+10^(pkac-x));

%Derivatives evaluation for gaseous components
PT=Pv+R*T*sum(U(31:33));           %bar      Total pressure of the gas phase
nTT=max(0,Kp*(PT-Pa));           %kmol/d Molar flow rate flowing ot of Vg
by overpressure
%
```

$F(31) = V1/Vg * rTh2 - U(31) * R * T * nTT / Vg / PT;$ %kmol/m3.d %Eqs.
 for pressurized
 $F(32) = V1/Vg * rTch4 - U(32) * R * T * nTT / Vg / PT;$ %kmol/m3.d
 %digestor. Gas exits
 $F(33) = V1/Vg * rTco2 - U(33) * R * T * nTT / Vg / PT;$ %kmol/m3.d
 %proportional to DP.

3. Datos Experimentales utilizados

Exp	Rep	T	pH2 (atm)	CH4 (mol/l)	pH	Ac (gDQO/L)	N (mol/L)
2	1	0,000	4,495E-01	0,000E+00	7,210	0,976	0,059
2	1	0,250	4,654E-01	-9,485E-05	7,210	1,175	
2	1	0,833	4,266E-01	1,253E-03	7,300	0,971	0,059
2	1	1,250		3,845E-03	7,330		
2	1	1,833	2,553E-01	4,934E-03	7,290	0,877	
2	1	2,833	2,468E-01	8,859E-03	7,280	0,528	
2	1	5,833	4,444E-04	1,721E-02	7,280	0,209	
2	1	7,833	2,440E-04	1,848E-02	7,300	0,077	
2	1	9,833	2,313E-04	2,310E-02	7,270	0,032	
2	1	12,833	1,730E-04	2,290E-02	7,300		
2	1	16,833	9,615E-05	2,291E-02	7,280		
2	1	19,833	2,876E-04	2,298E-02	7,310		0,060
2	1	34,833	0,000E+00	1,679E-02	7,310		
2	1	41,833	0,000E+00	1,561E-02	7,310		
2	2	0,000	4,645E-01	0,000E+00	7,240	0,990	0,064
2	2	0,250	4,442E-01	2,905E-04	7,240	1,225	
2	2	0,833	3,976E-01	1,305E-03	7,260	1,109	
2	2	1,250	3,817E-01	1,894E-03	7,320		
2	2	1,833		1,709E-02	7,330	0,846	
2	2	2,833	2,669E-01	8,827E-03	7,290	0,584	
2	2	5,833	2,016E-04	1,675E-02	7,310	0,873	
2	2	7,833	2,134E-04	1,961E-02	7,310	0,079	
2	2	9,833	2,856E-04	2,174E-02	7,270	0,037	
2	2	12,833	2,048E-04	2,286E-02	7,320		
2	2	16,833	1,056E-04	2,296E-02	7,290		
2	2	19,833	2,308E-04	2,398E-02	7,300		0,061
2	2	34,833	0,000E+00	1,381E-02	7,300		
2	2	41,833	0,000E+00	1,633E-02	7,300		
3	1	0,000	5,475E-01	0,000E+00	7,160	1,800	0,073
3	1	0,250	4,615E-01	2,995E-04	7,160	2,597	
3	1	0,833	4,627E-01	1,388E-03	7,280	2,363	
3	1	1,250	4,317E-01	2,219E-03	7,300		

3	1	1,833		2,152E-02	7,320	2,107	
3	1	2,833	3,081E-01	1,170E-02	7,310	1,853	
3	1	5,833	1,960E-04	2,860E-02	7,320	0,600	
3	1	7,833	2,045E-04	3,648E-02	7,340	0,291	
3	1	9,833	1,904E-04	4,151E-02	7,310	0,110	
3	1	12,833	1,500E-04	4,401E-02	7,350		
3	1	16,833	9,109E-05	4,373E-02	7,340		
3	1	19,833	1,839E-04	4,542E-02	7,330		0,069
3	1	34,833	0,000E+00	3,157E-02	7,330		
3	1	41,833	0,000E+00	3,001E-02	7,330		
3	2	0,000	5,410E-01	0,000E+00	7,160	2,117	0,074
3	2	0,250	4,595E-01	3,297E-04	7,160	2,729	
3	2	0,833	4,627E-01	1,157E-03	7,290	2,483	
3	2	1,250	4,233E-01	1,875E-03	7,310		
3	2	1,833	2,989E-01	5,351E-03	7,320	2,319	
3	2	2,833	3,088E-01	1,111E-02	7,280	1,972	
3	2	5,833	2,022E-04	2,769E-02	7,300	0,395	
3	2	7,833	2,094E-04	3,610E-02	7,350		
3	2	9,833	1,874E-04	4,082E-02	7,310	0,271	
3	2	12,833	1,452E-04	4,451E-02	7,370		
3	2	16,833	1,084E-04	4,626E-02	7,350		
3	2	19,833	1,301E-04	4,525E-02	7,350		0,072
3	2	34,833	0,000E+00	3,246E-02	7,350		
3	2	41,833	0,000E+00	2,965E-02	7,350		
4	1	0,000	5,851E-01	0,000E+00	7,160	3,401	0,092
4	1	0,250	4,651E-01	3,055E-04	7,160	4,189	
4	1	0,833	4,664E-01	7,163E-04	7,260	3,635	
4	1	1,250	4,365E-01	1,347E-03	7,320		
4	1	1,833	3,720E-01	4,588E-03	7,320	3,610	
4	1	2,833	2,995E-01	9,897E-03	7,280	3,461	
4	1	5,833	2,210E-04	3,196E-02	7,320	1,771	
4	1	7,833	5,362E-04	4,619E-02	7,350	0,859	
4	1	9,833	1,799E-04	5,317E-02	7,310	0,323	
4	1	12,833	1,530E-04	5,808E-02	7,390		
4	1	16,833	2,568E-04	5,862E-02	7,380		
4	1	19,833	1,961E-04	5,991E-02	7,400		0,089
4	1	34,833	0,000E+00	5,040E-02	7,400		
4	1	41,833	0,000E+00	4,796E-02	7,400		
4	2	0,000	4,198E-01	0,000E+00	7,170	2,828	0,092
4	2	0,250	6,404E-01	-9,485E-05	7,170	4,475	
4	2	0,833	9,986E-01	6,967E-03	7,270	3,557	
4	2	1,250	5,564E-01	2,670E-03	7,300		
4	2	1,833	5,379E-01	8,841E-03	7,310	3,670	

4	2	2,833	4,261E-01	1,712E-02	7,300	3,293	
4	2	5,833	2,512E-04	3,916E-02	7,330	1,766	
4	2	7,833	3,520E-04	5,454E-02	7,360	0,712	
4	2	9,833	1,794E-04	6,421E-02	7,340	0,275	
4	2	12,833	1,916E-04	6,850E-02	7,390		
4	2	16,833	1,469E-04	7,058E-02	7,410		
4	2	19,833	2,048E-04	7,079E-02	7,420		0,090
4	2	34,833	0,000E+00	5,872E-02	7,420		
4	2	41,833	0,000E+00	5,711E-02	7,420		
5	1	0,000	4,574E-01	0,000E+00	7,210	3,656	0,051
5	1	0,250	4,346E-01	2,980E-04	7,210	4,119	
5	1	0,833	4,357E-01	1,268E-03	7,300	3,750	
5	1	1,250	3,955E-01	1,998E-03	7,340		
5	1	1,833	3,337E-01	5,681E-03	7,320	3,646	
5	1	2,833	2,655E-01	1,087E-02	7,320	3,386	
5	1	5,833	2,629E-04	3,554E-02	7,350	1,679	
5	1	7,833	2,258E-04	4,890E-02	7,400	0,635	
5	1	9,833	1,851E-04	5,549E-02	7,420	0,253	
5	1	12,833	1,924E-04	6,518E-02	7,440		
5	1	16,833	2,390E-04	6,624E-02	7,420		
5	1	19,833	2,788E-04	6,720E-02	7,420		0,049
5	1	34,833	0,000E+00	5,691E-02	7,420		
5	1	41,833	0,000E+00	5,325E-02	7,420		
5	2	0,000	4,795E-01	0,000E+00	7,240	3,797	0,050
5	2	0,250	4,711E-01	3,058E-04	7,240	4,032	
5	2	0,833	4,610E-01	1,008E-03	7,320	3,805	
5	2	1,250	4,399E-01	1,541E-03	7,340		
5	2	1,833	3,754E-01	5,313E-03	7,330	3,628	
5	2	2,833	3,677E-01	1,022E-02	7,320	3,188	
5	2	5,833	2,640E-04	3,286E-02	7,350	0,033	
5	2	7,833	3,868E-04	5,222E-02	7,390	0,039	
5	2	9,833	1,848E-04	5,517E-02	7,410	0,277	
5	2	12,833	1,773E-04	6,471E-02	7,460		
5	2	16,833	2,401E-04	6,632E-02	7,440		
5	2	19,833	2,491E-04	5,656E-02	7,460		0,050
5	2	34,833	0,000E+00	5,703E-02	7,460		
5	2	41,833	0,000E+00	5,577E-02	7,460		
6	1	0,000	5,001E-01	0,000E+00	7,160	3,787	0,126
6	1	0,250	4,968E-01		7,160	4,466	
6	1	0,833	4,439E-01	7,580E-04	7,240	1,304	
6	1	1,250	4,163E-01	1,235E-03	7,280		
6	1	1,833	3,410E-01	4,456E-03	7,280	1,446	
6	1	2,833	2,257E-01	8,172E-03	7,260	3,549	

6	1	5,833	2,164E-04	3,070E-02	7,300	2,052		
6	1	7,833	1,658E-04	4,549E-02	7,320			
6	1	9,833	2,080E-04	4,962E-02	7,340	0,448		
6	1	12,833	1,650E-04	6,192E-02	7,350			
6	1	16,833	3,251E-04	6,498E-02	7,370			
6	1	19,833	2,159E-04	6,790E-02	7,360		0,114	
6	1	34,833	0,000E+00	4,591E-02	7,360			
6	1	41,833	0,000E+00	4,311E-02	7,360			
6	2	0,000	4,642E-01	0,000E+00	7,150	1,352	0,119	
6	2	0,250	4,529E-01	2,896E-04	7,150	4,380		
6	2	0,833	4,576E-01	4,789E-04	7,390			
6	2	1,250	4,280E-01	8,127E-04	7,430	3,006		
6	2	1,833	3,608E-01	2,633E-03	7,400	3,864		
6	2	2,833	3,119E-01	4,851E-03	7,390	3,703		
6	2	5,833	2,279E-04	1,772E-02	7,400	2,879		
6	2	7,833	1,794E-04	2,882E-02	7,420	0,277		
6	2	9,833	1,993E-04	4,003E-02	7,420	1,219		
6	2	12,833	1,540E-04	5,217E-02	7,470			
6	2	16,833	3,094E-04	5,864E-02	7,480			
6	2	19,833	2,514E-04	6,241E-02	7,490	0,064	0,113	
6	2	34,833	0,000E+00	4,212E-02	7,490			
6	2	41,833	0,000E+00	4,048E-02	7,490			
7	1	0,000	5,268E-01	0,000E+00	7,140	3,489	0,141	
7	1	0,250	4,621E-01	2,930E-04	7,140	3,507		
7	1	0,833	4,329E-01	5,979E-04	7,240	2,475		
7	1	1,250	4,150E-01	1,104E-03	7,280	2,422		
7	1	1,833	3,631E-01	3,678E-03	7,240	3,747		
7	1	2,833	2,914E-01	7,206E-03	7,210	3,484		
7	1	5,833	2,044E-04	2,670E-02	7,260	2,304		
7	1	7,833	1,172E-04	4,085E-02	7,280	0,369		
7	1	9,833	1,950E-04	5,477E-02	7,290	0,461		
7	1	12,833	2,592E-04	6,037E-02	7,330			
7	1	16,833	2,814E-04	6,251E-02	7,360			
7	1	19,833	2,975E-04	6,303E-02	7,370		0,138	
7	1	34,833	0,000E+00	5,468E-02	7,370			
7	1	41,833	0,000E+00	5,265E-02	7,370			
7	2	0,000	5,340E-01	0,000E+00	7,160	3,676	0,141	
7	2	0,250	4,790E-01	2,790E-04	7,160	4,189		
7	2	0,833	4,702E-01	5,800E-04	7,220	2,674		
7	2	1,250	4,443E-01	1,095E-03	7,270	2,398		
7	2	1,833	3,617E-01	3,655E-03	7,240	3,776		
7	2	2,833	3,593E-01	7,207E-03	7,230	3,538		
7	2	5,833	2,063E-04	2,385E-02	7,240	2,197		

7	2	7,833	4,014E-04	2,889E-02	7,290	0,369	
7	2	9,833	1,880E-04	5,151E-02	7,310	0,742	
7	2	12,833	3,635E-04	6,585E-02	7,400		
7	2	16,833	3,187E-04	6,924E-02	7,360		
7	2	19,833	2,513E-04	6,917E-02	7,370		0,137
7	2	34,833	0,000E+00	6,113E-02	7,370		
7	2	41,833	0,000E+00	5,881E-02	7,370		
8	1	0,000	5,163E-01	0,000E+00	7,150	3,660	0,171
8	1	0,250	5,163E-01	-9,485E-05	7,150	3,907	
8	1	0,833	4,785E-01	3,306E-04	7,210	2,347	
8	1	1,250	4,409E-01	8,093E-04	7,230	2,509	
8	1	1,833	3,446E-01	2,743E-03	7,210	3,693	
8	1	2,833	3,515E-01	6,799E-03	7,200	3,614	
8	1	5,833	1,894E-04	2,145E-02	7,230	4,149	
8	1	7,833	1,828E-04	3,505E-02	7,290	0,743	
8	1	9,833	2,016E-04	4,889E-02	7,280	0,562	
8	1	12,833	3,807E-04	6,422E-02	7,360		
8	1	16,833	2,182E-04	6,502E-02	7,330		
8	1	19,826	2,975E-04	6,303E-02	7,370		0,138
8	1	34,833	0,000E+00	3,896E-02	7,330		
8	1	41,833	0,000E+00	4,198E-02	7,330		