



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Diseño de un bioproceso de alta eficiencia para la remoción de cadmio vía *Desulfovibrio*
alaskensis 6SR: modelado, simulación, estimación y control.**

TESIS
Que presenta

Pablo Antonio López Pérez

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Dr. Ricardo Aguilar López**

México, D.F.

Marzo del 2013



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Ricardo Aguilar López.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CINVESTAV I.P.N ZACATENCO por las atenciones prestadas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con No. de registro 209840 durante el periodo Enero del 2010 – Abril del 2013 con la cual fue posible desarrollar el presente trabajo de investigación.



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Al **Dr. Ricardo Aguilar López** por su invaluable apoyo en la dirección de este proyecto y su amistad.

Al **Dr. Frédéric Thalasso Siret** por sus observaciones y comentarios sobre todo el desarrollo de la tesis.

A la **Dra. María Isabel Neria González** por su atención y comentarios durante todo el proyecto.

A la **Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas** por su atención y apoyo durante todo el proyecto.

Al **Dr. Luis Bernardo Flores Cotera** por su confianza y conocimiento durante todo el proyecto.

Al **Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya** por su confianza y conocimiento durante todo el proyecto.

A la **Dra. Zoila Flores** por la guía, sugerencia, consejos y amistad invaluable durante toda mi formación.

Al **Quím. Fernando Maldonado** por su apoyo, amistad y consejos durante mi formación.

A Central analítica del departamento de Biotecnología y Bioingeniería por su gran ayuda invaluable y principalmente a **QFB Elvira Ríos Leal y Cirino Chávez Rojas**.

A mis compañeros de Laboratorio **M. en C Fernando Alberto Cuevas Ortiz, M. en C Rigel V. Gómez-Acata, M. en C Vicente Peña Caballero, M. en C. B. Nayelly del Castillo Velasco** por todos sus apoyos y atenciones.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento por su apoyo y todas aquellas personas que han influenciado en mi formación académica y personal.



DEDICATORIA

En especial a mis padres, **Pablo López Romero y Esperanza Pérez García** por su apoyo y guía durante toda mi vida que me ha permitido salir adelante. A mis hermanos **Eldahid López Pérez y Rodolfo López Pérez** por su comprensión y ayuda, a mi **cuñado Luis Rodríguez**, y a él gran fruto de la familia a **Luis Kalep Rodríguez López** por la alegría que trajo a nuestra casa, así como a mi compañera, novia y amiga **Dulce Jazmín Hernández Melchor** por hacerme madurar, crecer y amarla, y a **Johana Hernández Melchor** por sus hermosas sonrisas.



“Intenta no volverte un hombre de éxito, sino volverte un hombre de valor.”

Albert Einstein



INDICE GENERAL

Resumen	15
Abstract	16
CAPÍTULO 1	17
INTRODUCCIÓN	17
1.1 Tratamiento de metales.	18
1.2 Bacterias sulfato reductoras (<i>Desulfovibrio alaskensis</i> 6SR)	20
1.3 Producción de biopelícula (exopolisacárido microbiano SPE y biomasa) para remoción de cadmio	22
1.4 Diseño de modelos matemático para bioreactores	23
1.4.1 Balances macroscópicos	26
1.4.1.1 Modelos cinéticos no estructurados	26
1.4.2 Balances microscópicos	29
1.5 Simulación de modelos matemáticos	30
1.6 Estimación y control de variables.	31



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

1.6.1	Optimización de procesos bio-tecnológicos utilizando herramienta de control y estimación	35
1.7	Justificación	39
1.8	Hipótesis de trabajo	39
1.9	Objetivos	39
	General	39
	Objetivos específicos	39
1.10	Estructura de la tesis.	40
	CAPÍTULO 2	42
	DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA GENERAL	42
2.1	Etapa 1	43
2.2	Etapa 2	43
2.3	Etapa 3	44
2.4	Etapa 4-5	44
	CAPÍTULO 3	51



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1 Concentración mínima inhibitoria	52
3.2 Cinética de remoción de cadmio	52
3.3 Diseño y simulación del modelo.	59
3.4 Observador propuesto	62
3.4.1 Análisis de observabilidad	62
3.4.2 Prueba de estabilidad del observador	63
3.5 Analisis de regulación	69
CAPÍTULO 4	72
CONCLUSIONES GLOBALES	72
CAPÍTULO 5	74
RECOMENDACIONES	74
CAPÍTULO 6	76
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXO A	82



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería	10
DEFINICIONES Y TEOREMAS DE APLICACIÓN	82
Estabilidad en el sentido de Lyapunov	83
Sistemas Autónomos	83
Definición A1	83
Definición A2	83
Observación A1	84
Método directo de Lyapunov	84
Teorema A1	84
Teorema A2	85
Método indirecto de Lyapunov	85
<i>Teorema A3</i>	85
Observación 2	86
Sistemas no autónomos	86
Definición A3	86
Definición A4	87
Método directo de Lyapunov para Sistemas No Autónomos	87
Teorema A4	87
Teorema A5	87
Teorema A6	88
Teorema A7	88



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería	11
Observación 3	88
Definición A5	88
Teorema A7	89
Teorema A8.	89
Definición A6	89
Definición A7	89
Definición A8	89
Definición A9	90
Proposición A1	90
Definición A10	90
Lema A1 de Barbalat	90
Definición A11	90
Definición A12	91
ANEXO B	92
ANEXO C	97
ARTÍCULOS ACEPTADOS	97



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características importantes en la clasificación de las bacterias sulfato reductoras (Castro et al. 2000).	21
Tabla 1.2 Modelos cinéticos de inhibición por producto	27
Tabla 1.3 Modelos cinéticos modificados (Zhang 2007)	28
Tabla1.4 Simuladores y propiedades para modelado intracelular y extracelular.[W: Windows, J: Java y L: Linux](Alves et al. 2006)	31
Tabla 1.5 Concentración mínima inhibitoria	52
Tabla 1.6 Análisis de estabilidad y observabilidad	63



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Descripción de modelos matemáticos.	24
Figura 1.2 Sistemas y elementos de bioprocesos para el diseño de modelos estructurados (Shimizu, 2002)	30
Figura1.3 Elementos de sistemas	33
Figura1.4 Elementos de sistemas	34
Figura1.5 Optimización de bio-procesos utilizando herramienta de control y estimación.	35
Figura1.6 Estructura de la tesis	41
Figura 1.7 Comportamientos de la reducción de sulfato: a) sulfato b) sulfuro y c) biomasa, sin metal [■] y con metal [●], con una concentración inicial de cadmio de 170 mg/L en condiciones anaerobias.	55
Figura 1. 8 Comportamientos de la oxidación de la fuente de carbono y producción de biopelícula (EPS-Biomasa): a) lactato, b) acetato y c) biopelícula, [■] sin metal y con metal [●].	56
Figura 1. 9 Comportamientos de la distribución de cadmio: a) líquido y b) biopelícula, con una concentración inicial de cadmio de 170 mg/L en condiciones anaerobias.	57
Figura 1.10 Representación microscópica de los mecanismos de reacción (Desulfovibrio alaskensis 6SR en presencia de Cd^{2+} 170 mg/L- 96 h, 100 nm AMT Camara system)	58
Figura 1.11 Comportamientos de la distribución de cadmio (<i>Desulfovibrio alaskensis</i> 6SR en presencia de Cd^{2+} (170 mg/L) para un tiempo de 72 h, 100 nm AMT Camara system)	61
Figura 1.12 Simulación en semi-continuo. Con $C = [100000000]^T$ y $y = S$ (Concentración de sulfato). ((○, □) Valores reales, (— —), Observador Luenberger y (—) Observador	



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

propuesto). Las perturbaciones son alimentadas en forma de escalón en función de la tasa de dilución que representan valores de máxima eliminación de cadmio $D = 0.01h^{-1}$ así como a la mínima concentración de eliminación de cadmio $D = 0.1h^{-1}$. 68

Figura 1.13 Diagrama fase para diferentes tasas de dilución $D=0$ (— — —), $D=0.015$ (— —), $D=0.02$ (•••) and $D=0.05$ (——). 70

Figura 1.14 comparación del desempeño del controlador propuesto (•—•) con PI (——) y un modos deslizantes (— —) para la concentración de sulfuro, también se presenta para el controlador propuesto la regulación de la concentración de cadmio (•••), el PI (•▼•), y por último el modo deslizantes (•■•). 70

Figura 1.15 Esfuerzo de controlabilidad: Control propuesto (•—•), PI (——) y modos deslizantes (— —) 71



Resumen

En esta tesis se desarrollaron estudios experimentales y numéricos para evaluar la capacidad de eliminación de cadmio por *Desulfovibrio alaskensis* 6SR. Por otra parte, se diseñó un modelo matemático no estructurado para simular la eliminación de cadmio (Cd^{2+}) por cultivos anaerobios de *Desulfovibrio alaskensis* 6SR, la cual es una bacteria sulfato reductora. Tres procesos se consideran en el modelo: 1) el proceso de reducción de sulfato, 2) el consumo de lactato como la fuente de carbono, y 3) la eliminación de metal. El modelo se probó con diferentes concentraciones iniciales de Cd^{2+} (50, 100, 170, y 190 mg /L), y se predijo con exactitud el comportamiento de los datos experimentales con coeficientes de correlación satisfactorios ($R^2 > 0.97$). Además, el modelo mostró que la tasa de producción de H_2S y la concentración inicial de Cd^{2+} , son variables clave de operación en un biorreactor. *Desulfovibrio alaskensis* 6SR fue capaz de eliminar más del 99.9% de cadmio en un proceso por lotes, donde la concentración inicial fue de 170 mg/ L. Este modelo se ha extendido a una operación en continuo, que se emplea como una planta virtual para permitir la aplicación de un controlador propuesto. La ley de control no lineal propuesta contiene una retroalimentación sigmoideal del error de control con el fin de regular la concentración de sulfuro en el valor máximo que conduce indirectamente a concentraciones de Cd^{2+} que cumplan con normativas medioambientales. Un marco teórico de la estabilidad a lazo cerrado del biorreactor se proporciona bajo el supuesto que las trayectorias limitadas pueden presentarse en el biorreactor. Por último, los experimentos numéricos demostraron rendimientos satisfactorios de la metodología propuesta en comparación con los controladores PI lineal estándar y un modo deslizantes. Además, se presentó un observador no lineal para realizar el proceso de estimación en el biorreactor. El estimador de estado propuesto se elaboró basado en el conocimiento de una variable medida en línea como el sulfato de modo que, cinco estados se estimaron. La convergencia de la metodología propuesta se analizó mediante la teoría de estabilidad de Lyapunov.



Abstract

Experimental studies were carried out to evaluate the high capacity of cadmium removal by *Desulfovibrio alaskensis* 6SR. Besides In this thesis an unstructured-type mathematical model was developed to simulate cadmium (Cd^{2+}) removal by *Desulfovibrio alaskensis* 6SR, which is a recently described sulfate reducing bacterium, whose capacity for removing heavy metals is being studied. Three processes are considered in the model: 1) the sulfate reduction process, 2) the consumption of lactate as carbon source, and 3) the metal removal. The model was tested with different initial Cd^{2+} concentrations (50, 100, 170, and 190 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and it accurately predicted the behavior of experimental data with satisfactory correlation coefficients ($R^2 > 0.97$). In addition, the model showed that the H_2S production rate and initial concentration of Cd^{2+} are key operating variables of a bioreactor. *Desulfovibrio alaskensis* 6SR was able to remove more than 99.9% of Cd^{2+} in a batch process, with the initial concentration was 170 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. This model has been extended to continuous operation, which is employed as a virtual plant to enable the implementation of the proposed controller. The considered nonlinear control law contains a sigmoid feedback of the given control error in order to regulate the sulfide concentration at the maximum value indirectly leading to cadmium concentrations meeting the environmental regulations. A theoretical frame of the closed-loop stability of the bioreactor is provided under the assumption that bounded trajectories occur in the bioreactor. Finally, numerical experiments proved satisfactory performance of the proposed methodology in comparison with the standard sliding-mode and linear PI controllers. Furthermore, it is presented a nonlinear observer to perform the estimation process the in bioreactor. The state estimator proposed was developed based on knowledge of only one on-line measurable variable, the sulfate concentration so that, four states were estimated. The convergence of the proposed observer methodology was analyzed employing Lyapunov stability theory.



Capítulo 1

Introducción



1.1 Tratamiento de metales.

Algunos estudios se han enfocado a investigar el potencial de los microorganismos, principalmente bacterias y hongos, en la remoción de los metales pesados especialmente aquellos provenientes de efluentes industriales. También, se están desarrollando tecnologías que incluyen el uso de los microorganismos como agentes de remoción, como una alternativa a los procesos fisicoquímicos o bien como complemento de éstos. En la actualidad el tratamiento de los residuos y descargas de efluentes tienen que cumplir con estándares de calidad cada vez más exigentes. La mayoría de los procesos de tratamiento de aguas residuales deben ser compatibles y cumplir con criterios como:

- ✓ Un proceso biológico debe ser complementario a los procesos existentes.
- ✓ **El proceso debe ser suficientemente flexible a las perturbaciones en la cantidad y composición de los sustratos presentes en el efluente.**
- ✓ Deben ser eficientes, confiables y operar de manera continua como en la mayoría de los procesos fisicoquímicos.
- ✓ **Tienen que ser lo suficientemente robustos mediante un sistema de monitoreo, predicción, diagnóstico de fallas y control para optimizar el proceso.**

Entre los métodos de tratamiento más simples para la remoción de metales pesados, se encuentra el de cambio de pH, el cual es un método económico de remoción de metales en solución. Sin embargo, este tipo de proceso no es selectivo y se pueden tener grandes cantidades de precipitados, pero puede ser muy eficiente por la insolubilidad de su precipitado, en este caso el costo dependerá de la concentración del metal, la necesidad de tratamientos secundarios, remoción de residuos, etc.

Entre los metales pesados, el cadmio es considerado como uno de los contaminantes ambientales más importantes, debido a su gran versatilidad de usos. El cadmio también se utiliza en la fabricación de



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

contenedores de alimentos, aleaciones, pinturas, baterías, cueros, etc. Es un metal pesado relativamente poco abundante; es uno de los metales más tóxicos, aunque podría ser un elemento químico esencial para microorganismos, necesario en micro cantidades, pero esto no está claro (Acheampong et al. 2010). Es insoluble en bases, se disuelve en ácido nítrico diluido y es poco soluble en los ácidos sulfúrico y clorhídrico, es un elemento que en muy bajas cantidades afecta mecanismos y funciones fundamentales de diferentes organismos, incluidos los humanos, siendo los órganos más importantes el hígado y el riñón, caracterizado este último por su efecto adverso sobre la función renal ocasionando proteinuria.

El cadmio es tóxico para el cultivo de plantas de frijol, remolacha y nabos en concentraciones de 0.1 mg/L. La NORMA OFICIAL MEXICANA (NOM-001-ECOL-1996), indica como un límite máximo permisible en suelo de 0.05 mg/L y en ríos de 0.1 mg/L.

¿Por qué escoger un proceso biológico para el tratamiento de metales pesados, cuando en la industria existen una variedad de tecnologías?

Los microorganismos tienen la capacidad para degradar una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Das et al. 2008). Cabe mencionar que los microorganismos no mineralizan a los metales, sin embargo, tienen la capacidad de modificar su estado de oxidación ya sea por la excreción de un metabolito o bien por la acción enzimática.

Los microorganismos pueden remover los metales por tres mecanismos; bio-precipitación, acumulación y bio-absorción (Wase y Forster 1997). Un ejemplo de estos son las bacterias sulfato reductoras (BSR), que mediante la producción de sulfuro de hidrógeno son capaces de precipitar el metal.



1.2 Bacterias sulfato reductoras (*Desulfovibrio alaskensis* 6SR)

Existe un interés en el potencial biotecnológico de los sistemas sulfatos reductores, como un método alternativo para la remoción de metales pesados presentes en el ambiente (Chang et al. 2000; Elliott et al. 1998; Kim et al. 1999). Las bacterias sulfato reductoras son estrictamente anaerobias, capaces de reducir el sulfato a sulfuro de hidrógeno. Se clasifican en base a la temperatura en: mesofílicas y termofílicas, y pueden crecer en un intervalo de pH de 6-8 (Postgate 1984). Aunque, algunas especies crecen a pH ácidos entre 3-4 (Hedin et al. 1991). Las BSR comprenden un grupo heterogéneo desde el punto de vista fisiológico y morfológico y tienen gran importancia ecológica en los ciclos del carbono y del azufre, mineralizando la materia orgánica en los ambientes anaerobios. En los sedimentos marinos el 50% de la materia orgánica es oxidada por sulfato-reducción (Ito et al. 2002). Las BSR están ampliamente distribuidas, aun en ambientes con bajos niveles de sulfato, como los cuerpos de agua dulce, tienen relevancia en la mineralización de la materia orgánica (Holmer and Storkholm 2001). Diferentes compuestos orgánicos incluyendo los ácidos orgánicos y alcoholes son asimilados como su fuente de carbono y electrones, algunas especies son capaces de utilizar al H_2 como donador de electrones cuando se asimila el CO_2 como fuente de carbono (quimilitotrofia). Un aspecto característico del metabolismo de las BSR, es la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) durante la reducción del sulfato. El sulfuro de hidrógeno es tóxico, de un aroma característico, corrosivo y es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos tanto anaeróbicos como aeróbicos (Gibson, 1990). El sulfuro producido puede reaccionar con metales disueltos para formar sulfuros metálicos que forman precipitados, ya que la solubilidad de la mayoría de los sulfuros de metales son generalmente muy bajas (Kim et al. 1999). Las BSR, también tienen implicaciones industriales (biocorrosión), ambientales (biorremediación) y en salud (inflamación del intestino) (Bartosch et al. 2004; Matías et al. 2005). En la tabla 1.1 se resumen algunas características de este grupo bacteriano.



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Tabla 1.1. Características importantes en la clasificación de las bacterias sulfato reductoras (Castro et al. 2000).

	Forma	Movilidad	% GC en DNA	Desulfovirina	Citocromos	Oxidación de acetato	Crecimiento T (°C)
<i>Desulfohalobium</i>	Limón alargado	-/+	59-60	-	b, c, c ₃	I ^a	25-40
<i>Desulfomicrobium</i>	Ovalo	+/-	52-67	-	b, c	I	25-40
<i>Desulfomonas</i>	Alargada	-	66	+	C	I	30-40
<i>Desulfovibrio</i>	Espiral	+	49-66	+/-	b, c, c₃	I	25-40
Bacterias Gram-positivas formadoras de esporas							
<i>Desulfotomaculum</i>	Curva alargada	+	48-52	-	b, c	I/C	25-40 40-65
Bacterias Termofílicas							
<i>Thermodesulfobacterium</i>	Alargada en forma de ovulo	+	30-38	-	c, c ₃	I	65-70
Arqueas Termofílicas							
<i>Archaeoglobus</i>	En forma de coco	+/-	41-46	-	n.r. ^c	I	64-92

I^a: Incompleta

C: Completa

n.r.^c: no reportado

Dentro de este campo *Desulfovibrio alaskensis*, fue aislada de un oleoducto en Alaska, por Feio et al. (2004), es una bacteria gram negativa, no forma esporas, tiene un tamaño de 1.0 - 5.0 X 0.5 - 1.2 µm. Las células se presentan en forma de bacilos curvos, aislados y son móviles, tiene un flagelo polar, crecen a un pH de 6.6-8.5 con un óptimo de 7, y a intervalos de temperatura de 10 – 45 °C, siendo el óptimo de 37 °C; se considera un halófilo moderado, NaCl 0-10 %, con una concentración óptima del 2.7 %. La velocidad máxima de crecimiento es de 0.133 h⁻¹ en medio **POSTGATE C** (Feio et al. 2004). Como fuente de carbono se utiliza el lactato y no se requiere de vitaminas para su crecimiento. Es capaz de reducir el sulfato, sulfito y tiosulfato para la producción de sulfuro. La cepa de *Desulfovibrio alaskensis* 6SR fue aislada de una biopelícula desarrollada en un oleoducto de la zona



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

del sureste mexicano, y difiere de la cepa descrita por Feio (Feio et al. 2004), en que es capaz de crecer a una concentración óptima del 3% de cloruro de sodio, a pH de 7 y una temperatura de 40 °C.

1.3 Producción de biopelícula (exopolisacárido microbiano SPE y biomasa) para remoción de cadmio

Las Sustancias poliméricas extracelulares (SPE) es una mezcla compleja de bio-polímeros compuesto por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, ácidos urónicos, lípidos, etc. Funcionalmente el EPS ayuda a la agregación de células, la adhesión de sustrato, la formación de floculos, la protección contra la desecación y la resistencia a materiales exógenos nocivos (Beech and Sunner et al. 2004). Por otra parte, el biopolímero sirve como agente absorbente mediante la acumulación de nutrientes del ambiente, realizando además un papel crucial en la biosorción de metales pesados. Por tener la propiedad polianiónica permite la inmovilización de metales, generalmente mediante interacciones electrostáticas entre los metales cargados positivamente y los componentes negativos del SPE (Flemming and Wingender 2010). La eliminación de metales pesados en el medio ambiente utilizando bio-absorbentes como la formación de biopelículas ha sido estudiada para los procesos de biorremediación, este proceso es una alternativa más económica y más segura que los métodos químicos (Salehizadeh and Shojaosadati 2003). Además han sido respaldado mediante estudios de IR, Rayos X, Espectroscopia de barrido (White and Gadd 1998). Trabajos han reportado una adsorción de metales hasta en 10.6 mg/L utilizando *Rhizobium* teniendo afinidad por Pb (II) y Cu (II). Del mismo modo, *Paenibacillus jamilae* ha crecido en extractos acuosos, el SPE producido es capaz de absorber las concentración de metales pesados en el siguiente orden: Pb > Cd > Cu > Zn > Ni > Co (Morillo et al. 2006). Utilizando consorcios de BSR se han removido hasta 300 mg/L de Cd (II) promedio mediante precipitación vía sulfuro (Renedo et al. 2007) y 500 mg/L de Cd han sido removidos vía adsorción y precipitación en una planta de tratamiento de aguas residuales en Bejín- China con una eficiencia del 92% y una relación metal- EPS de 2720 mg/g (Zhang et al. 2006).



1.4 Diseño de modelos matemático para biorreactores

La modelación matemática es un instrumento utilizado para describir procesos físicos, químicos, económicos y biológicos, entre otros, son una herramienta valiosa para predecir su comportamiento dinámico, y son posteriormente aplicables al diseño, evaluación y control de procesos (Moosa et al. 2002; Ferentinos, 2005; Vande Wouwer et al., 2004; Karakuzu et al., 2006). Estos modelos se expresan a través de balances de materia y energía que toman en cuenta la cinética de reacción de los procesos (procesos de transformación), la hidrodinámica (tipo de flujo y mezcla en el reactor) y el transporte de materia a través de los límites del sistema (flujos de entrada y salida).

Algunas características específicas de cada sistema son: configuración del reactor, distribución del influente, mezcla, dispersión, recirculación, extracción de lodo, etc. Los procesos de transformación, por el contrario, ocasionan cambios en la estructura con una velocidad que depende de las condiciones del proceso. Los modelos son relacionados a través de ecuaciones que cumplan con leyes de conservación de masa (balances), las cuales se deben resolver, para poder describir los cambios en el estado del sistema a través de las variables de estado (concentraciones de biomasa, oxígeno, DQO, nitrógeno, por ejemplo)

$$\sum \left[\begin{array}{c} \text{Flujos de entrada} \\ g / \text{día} \end{array} \right] - \sum \left[\begin{array}{c} \text{Flujos de salida} \\ g / \text{día} \end{array} \right] + \sum \left[\begin{array}{c} \text{Terminos} \\ \text{cineticos} \\ g / \text{día} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{demateria} \\ g / \text{día} \end{array} \right] \quad (1)$$

Modelo: Un modelo (**M**) para un sistema (**S**) y un experimento (**E**) es cualquier cosa a la cual se le pueda aplicar **E**, para obtener respuesta a preguntas acerca de **S**. Toda descripción del comportamiento de un sistema constituye un modelo de éste, esto es modelar y significa organizar el conocimiento que se posee de un sistema, y no puede estar separada del contexto experimental que da lugar a la construcción del modelo.



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Simulación: Al proceso de formular cuestionamientos a una descripción, se le denomina simulación (con los modelos se simula, con los sistemas físicos se experimenta).

Complejidad de un modelo: Cantidad de información estructurada que le da forma

Modelo matemático: Es aquel que puede ser codificado en términos de un programa de cómputo. Por programa de cómputo se entiende: “Un conjunto de reglas lógicas que fijan los modos de procesamiento de cierta información cuantitativa”.

Estado del sistema dinámico: Conjunto de variables descriptivas que almacenan la evolución temporal del sistema.

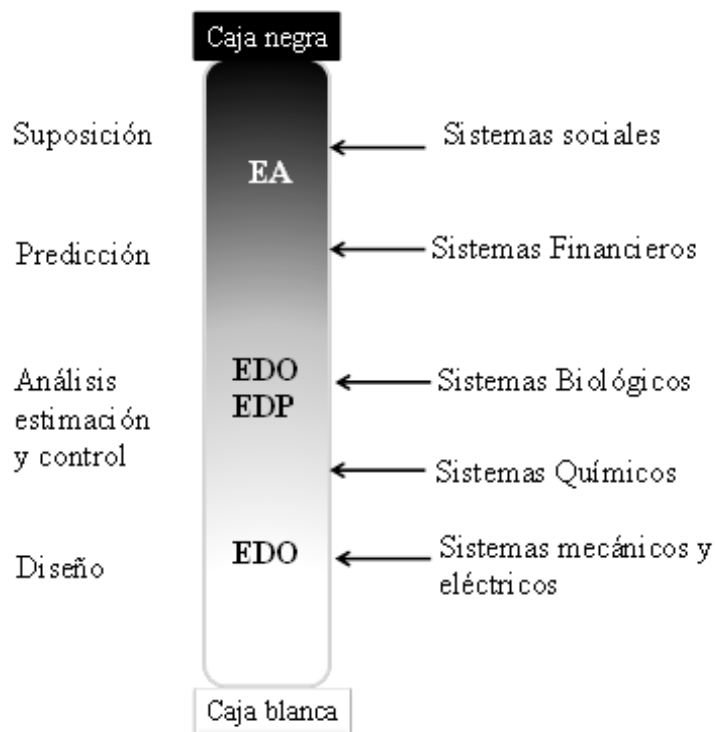


Figura 1.1 Descripción de modelos matemáticos.

Un modelo matemático es una representación limitada debido a incertidumbres como:



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

1. Parámetros desconocidos (Incertidumbre paramétrica)
2. Dinámicas desconocidas (Incertidumbre dinámica)
3. Estados sin medir (Incertidumbre estática)

Modelos matemáticos:

- Modelos en tiempo continuo. Se caracterizan por el hecho que, en un rango de tiempo finito, las variables de estado cambian sus valores infinitamente. La codificación del modelo suele utilizar ecuaciones diferenciales. Esta es la clase de modelos matemáticos más comúnmente empleados por los teóricos del control automático.
- Modelos en tiempo discreto. En esta clase de modelos la variable temporal es discreta. La codificación del modelo suele utilizar ecuaciones en diferencias (modelos de sistemas continuos controlados por medio de computadoras digitales).
- Modelos cualitativos. Son por naturaleza modelos en tiempo discreto y sus variables dependientes están discretizadas. Se codifican usualmente por medio de representaciones de estado finito
- Modelos a eventos discretos. Tanto la variable temporal, como las variables de estado, son esencialmente continuas. Se diferencian de los modelos en tiempo continuo por el hecho de que en un rango temporal finito solo puede ocurrir un número finito de cambios en el estado.
- Modelos de parámetros concentrados. Estos modelos poseen variables (generalmente dependientes del tiempo) que no están ligadas al estado y que describen propiedades que se consideran concentradas espacialmente.
- Modelos de parámetros distribuidos. Los parámetros describen interacciones del sistema dinámico descrito con campos distribuidos espacialmente.



1.4.1 Balances macroscópicos

Los modelos a nivel macroscópico son muy útiles ya que pueden ser empleados con fines prácticos: para el escalamiento de biorreactores, para predecir comportamientos bajo diferentes condiciones de operación, para nuevos diseños de equipos, simulación, control y diagnóstico de fallas, los cuales están conformados por balances de materia fenomenológicos que representan especies macroscópicas como son: biomasa, sustrato, productos de interés y reacciones irreversibles que suceden en el medio de cultivo (Dunn et al. 2003; Rani and Rao 1999; Schugerl and Bellgardt 2000; Bastin y Dochain 1990). Los modelos cinéticos son herramientas poderosas para describir y comprender el comportamiento de sistemas celulares complejos.

1.4.1.1 Modelos cinéticos no estructurados

La limitación de los modelos no estructurados se debe a que no toman en cuenta explícitamente el cambio de estado fisiológico de las células, puesto que no contienen variables que midan la concentración de la biomasa en función del medio ambiente. Existen diversas expresiones para expresar el crecimiento microbiano, la más difundida es la ecuación de Monod, que relaciona el valor de μ con la concentración de un componente del medio de cultivo.

$$\mu_{max} \left[\frac{S}{k_s + S} \right] \quad (2)$$

Donde S es la concentración de sustrato limitante, μ_{max} es la velocidad de crecimiento específica máxima, y k_s se conoce como constante de saturación. En promedio las bacterias poseen valores de, μ_{max} cercanos a 0.9 h^{-1} , las levaduras 0.45 h^{-1} y los hongos filamentosos 0.25 h^{-1} . En los sistemas biológicos se ha estudiado la dinámica de bioprocesos mediante otros modelos cinéticos no estructurados del tipo Monod, así como aquellos que consideran inhibición por sustrato y producto



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

(Moosa et al. 2002; Moosa et al. 2005; Chen and Hashimoto 1980). El crecimiento de los microorganismos se puede ver afectada por la presencia de algún compuesto inhibitorio como la presencia del sulfuro de hidrogeno en bacteria reductoras de sulfato o una alta concentración de un metal. (Pavlostathis y Giraldo-Gómez 1991). La expresión de la inhibición a competitiva se denomina, también, cinética de Haldane, y ha sido utilizada para expresar la inhibición por el propio sustrato (S) o por el producto (P).

Tabla 1.2 Modelos cinéticos de inhibición por producto

Modelo	Ecuación
Boulton	$\left[\frac{\mu_m k_p}{P + k_p} \right]$
Levenspiel	$\mu_m \left[1 - \frac{P}{k_p} \right]^m$
Luong	$\mu_m \left[1 - \left(\frac{P}{k_p} \right)^m \right]$

Además de modificaciones de estos como se consideran en este trabajo:



Tabla 1.3 Modelos cinéticos modificados (Zhang 2007)

Modelo	Ecuación
Haldane-Boulton	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S}{k_s + S + S^2 k_I^{-1}} \right] \left[\frac{k_P}{k_P + P} \right] X$
Haldane-Levenspiel	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S}{k_s + S + S^2 k_I^{-1}} \right] \left[1 - \frac{P}{k_P} \right]^m X$
Haldane-Luong	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S}{k_s + S + S^2 k_I^{-1}} \right] \left[1 - \left(\frac{P}{k_P} \right)^m \right] X$
Moser-Luong	$\mu(S, P, X) = \left[\frac{\mu_m S^n}{k_s + S^n} \right] \left[1 - \left(\frac{P}{k_P} \right)^m \right] X$
Levenspiel	$\mu(S, P, X) = \mu_m \left[\frac{S}{k_s + S} \right] \left[1 - \left(\frac{P}{P^*} \right) \right] X$
Aiba	$\mu = \left[\frac{\mu_m S^n}{k_s + S^n} \right] \exp\left(\frac{-S}{k_I}\right)$
Contois	$\mu = \left[\frac{\mu_m S}{k_s X + S} \right]$
Chen y Hashimoto	$\mu = \left[\frac{\mu_m S}{k_s X_0 + (1 - k_s) S} \right]$



Andrew's

$$\mu = \left[\frac{\mu_{\max} S}{(k_s + S)(1 + SK_I^{-1})} \right]$$

Haldane y Moser, solo pueden describir el consumo de sustrato y los modelos de Boulton, Levenspiel y Luong, sólo describen la formación de producto. Muchos de estos modelos no son muy eficientes cuando se cambia el régimen de operación, por ejemplo una operación del bioreactor en continuo, esto puede ser debido a que no representan el comportamiento bioquímico o mecanismo de reacción de los fenómenos biológicos, por lo que es necesario incorporar esquemas estructurados (Yamanishi 2007). Se han desarrollado otros modelo cinéticos mediante la reconstrucción e identificación de las reacciones involucradas en las rutas metabólicas del microorganismo de interés, principalmente en el seguimiento de carbono presente en el sustrato (Spirin et al. 2006).

1.4.2 Balances microscópicos

Los modelos estructurados simples han sido revisados por Anand y Dougla 2000; Jeff et al. 2001; Robert y Tom 2001; Tyson et al. 2001 Bellgardt 2000. Se pueden considerar como extensiones de los modelos no estructurados. De una manera general, los modelos estructurados hacen énfasis en las reacciones enzimáticas y rutas metabólicas para describir una cinética (empírica). El modelamiento a nivel intracelular, recientemente, ha tenido un desarrollo a partir del concepto de la biología de sistemas (Alper y Moxley 2004; Schaefer y Futran 2004). Se puede diseñar un modelo estructurado representativo de la dinámica intracelular tan complejo como eficiente según el grado de solución y objetivos (Figura 1.2).



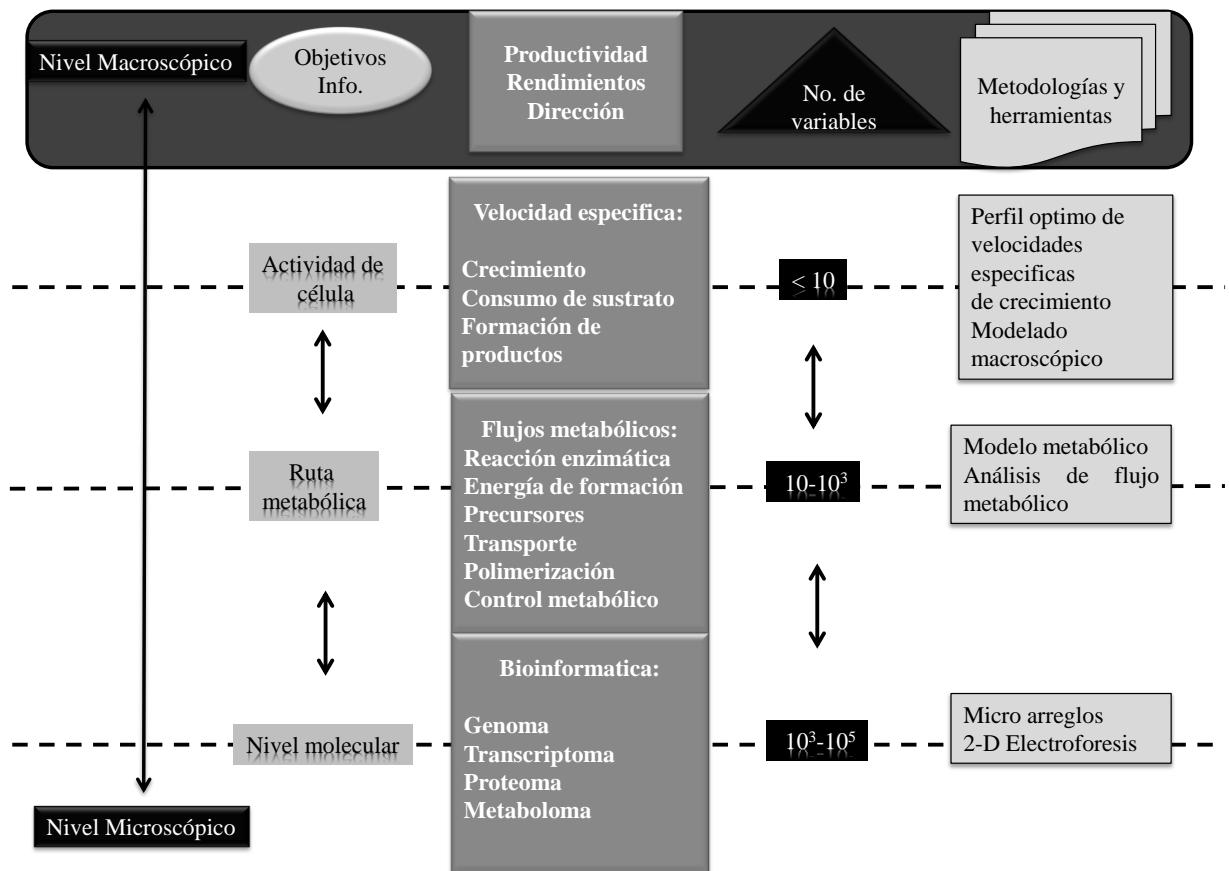


Figura 1.2 Sistemas y elementos de bioprocesos para el diseño de modelos estructurados (Shimizu, 2002)

1.5 Simulación de modelos matemáticos

Una vez que las ecuaciones cinéticas han sido involucradas en un balance de materia y los parámetros se han formulado, el modelo puede ser sometido al paso de simulación, esto con el objetivo de estudiar su comportamiento dinámico y las propiedades de su solución (Alves et al. 2006; Gombert and Nielsen 2000; Sevillea y Bertalan 2000). La mayoría de los programas de simulación utilizan rutinas para resolver las ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) como por ejemplo: el método numérico Runge-Kutta. Por otro lado, estos software permiten diseñar redes lógicas con el fin de describir los



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

mecanismos involucrados (reacciones químicas) y obtener su solución, cada programa tiene una interface gráfica de usuario (GUI) que permite la programación rápida del modelo matemático, algunos de estos programas para simulación se presentan en la tabla 1.4.

Tabla 1.4 Simuladores y propiedades para modelado intracelular y extracelular.[W: Windows, J: Java y L: Linux](Alves et al. 2006)

Tipo de programa	Programa	EDO,S	Estocástico	Estados estacionarios	Análisis de estabilidad	Análisis de sensibilidad	Exploración de parámetros	Perturbación	Estimación	Representación grafica	Múltiples reacciones	Diseño de red	Expresiones cinéticas	S.O.
Simuladores	Cell Designer	•					•	•		•	•	•	•	W,L
	CellWare	•	•						•	•	•	•	•	W,L
	COPASI	•	•	•	•	•	•	•	•				•	W,L
	Dizzy	•	•					•						W,L
	Dynetica	•	•				•					•	•	W,L
	GEPASI	•		•	•	•	•		•	•	•		•	W
	Pasadena Twain	•					•							W
	PLAS	•		•	•	•		•						W
	Model Maker	•		•	•	•			•		•		•	W
	Matlab	•	•	•	•	•		•	•	•				W
Modelos celulares	JDesigner/Jarnac	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	W
	JSim	•			•		•	•	•					W
Simuladores vía internet	BASIS		•					•					•	W
	Virtual Cell	•								•	•	•	•	J

1.6 Estimación y control de variables.



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Antes de iniciar con un tema tan amplio es necesario responder dos preguntas:

1. ¿Qué estudia la teoría matemática del control automático?

Estudia, con base en *modelos matemáticos*, los mecanismos que dotan a los sistemas dinámicos de la capacidad de comportarse de manera autónoma.

2. ¿Qué es un sistema dinámico?

Sistema: Fuente potencial de datos. Sistema dinámico: Es aquel que genera datos que cambian con el paso del tiempo, esto es, que poseen cierta dinámica.

Clases de sistemas dinámicos

- AISLADOS: No interactúan con su entorno.
- NO AISLADOS: Interactúan con su entorno.
- NATURALES: Ajenos a la intervención humana.
- ARTIFICIALES: Creados por el hombre.
- FISICOS: Involucran a la materia y a la energía.
- NO FISICOS: Pensamientos.

En general, un sistema puede poseer dos clases de canales a través de los cuales fluye la información en forma de señales:

LOS DE ENTRADA. Estos canales existen a su vez en dos tipos diferentes: los accesibles a la manipulación y los inaccesibles a ésta. Por medio de los canales de entrada accesibles a la



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

manipulación se le puede proveer información al sistema (Figura 1.3).

LOS DE SALIDA: Estos canales existen en dos tipos: los que proveen información medible y los que son inaccesibles a la medición (la cual en ciertas circunstancias puede ser observada, esto es una medición *indirecta*).

En el caso de los canales de entrada, las señales que son inaccesibles a la manipulación suelen denominarse perturbaciones (o disturbios). Además existen circunstancias en las que las perturbaciones pueden ser medidas y a veces se les puede manipular para que no afecten el comportamiento del sistema (en términos coloquiales se podría decir que las perturbaciones proveen de información al sistema afectado, lo cual podría llevarlo a modificar su comportamiento real). Los canales de circulación de señales con los que cuentan los sistemas, proveen el medio que permite (cuando es posible) la manipulación del sistema (*experimentación, control*) y su monitoreo (*observación, medición*), Figura 1.4.

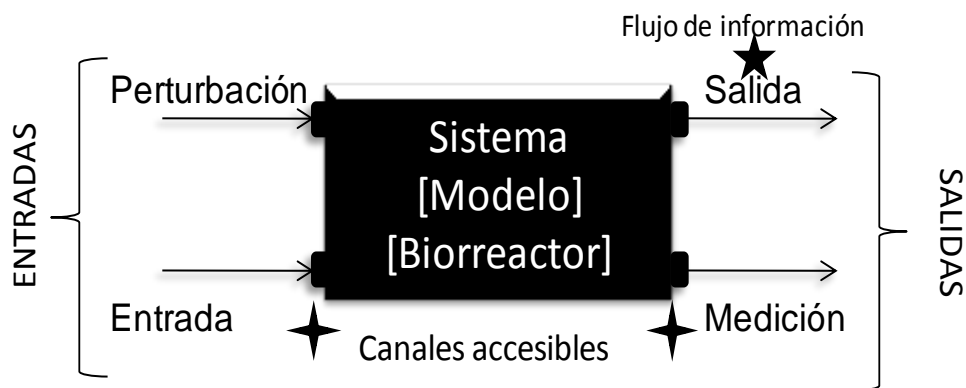


Figura1.3 Elementos de sistemas

¿En qué consiste un problema de control?



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Considere un sistema representado de manera esquemática por la siguiente figura:

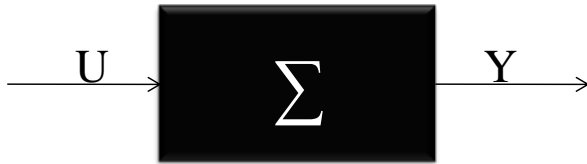


Figura 1.4 Elementos de sistemas

El sistema está caracterizado por un conjunto de entradas (U), un conjunto de salidas (Y) y un conjunto de variables internas (Σ), que incluyen las variables de estado y cualesquiera otras variables algebraicas (Figura 1.4).

La situación “normal” para un problema de simulación se presenta cuando todas las entradas están dadas y cuando la estructura del sistema y las condiciones iniciales de todas las variables de estado están especificadas. Por lo tanto se presentan tres casos en la teoría de control desde un punto de vista de sistemas:

Caso 1 Simulación de un modelo

La tarea de la simulación es determinar el comportamiento de las trayectorias de todas las variables de salida, esto es:

$$\text{“}U\text{” y “}\Sigma\text{” son conocidos lo que implica que; “}Y\text{” es desconocido (simulación)} \quad (3)$$

Caso 2 Control

Si el sistema tiene un problema de estimación tenemos

$$\text{“}\Sigma\text{” y “}Y\text{” son conocidos lo que implica que; “}U\text{” es desconocido} \quad (4)$$

Caso 3 Estimación

Si el sistema tiene un problema de estimación tenemos



“U” y “Y” son conocidos lo que implica que; “ Σ ” es desconocido (5)

Los procesos bio-tecnológicos ofrecen una gran oportunidad para los sistemas de control y monitoreo (figura 1.5) debido a su comportamiento complejo, modelos no lineales, sensibilidad a cambios externos e internos, condiciones iniciales diferentes, mediciones ruidosas, entre otras (Ewart et al. 2006; López et al. 2009).

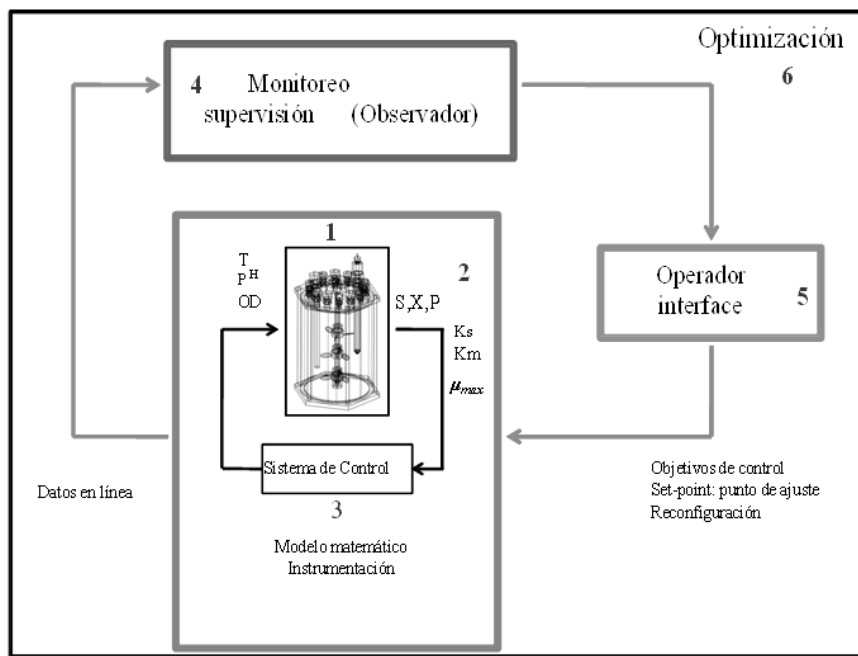


Figura1.5 Optimización de bio-procesos utilizando herramienta de control y estimación.

1.6.1 Optimización de procesos bio-tecnológicos utilizando herramienta de control y estimación

Steffens y Lant, (1999) mencionan que “el problema de control es por definición un problema multivariable: es decir hay múltiples objetivos de control y múltiples variables manipuladas”. Además, las relaciones entre las entradas y salidas son complejas (no lineales y con variación en el tiempo).



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Weijers (1995) en su trabajo menciona que “en vista de las características del proceso, que es no lineal y el tiempo variante (como consecuencia el cambio en los parámetros), uno podría esperar que el uso de control más avanzado y robusto podría mejorar el rendimiento con respecto a un control clásico”.

El control automático es el mantenimiento de un valor deseado para una cantidad o condición física midiendo su valor actual, comparándolo con el valor de referencia y utilizando la diferencia para proceder a reducirla mediante una acción correctiva. En consecuencia, el control automático exige un lazo cerrado de acción y reacción que funcione sin intervención humana. La base para controlar cualquier sistema técnico es la selección de estructura de control conveniente. Según Larsson y Skogestad (2000), el diseño de la estructura de control incorpora cinco tareas:

- i. Selección de variables a controlar
- ii. La selección de variables a manipular
- iii. Variables a medir
- iv. Selección de configuración de control (un interconectar de estructura Measurements/setpoints y variables manipuladas)
- v. La selección de tipo de regulador (controla la especificación de la ley, por ejemplo: PID)

Según Larsson y Skogestad (2000), existen dos formas de seleccionar la estructura de control: uno puramente matemático, un poco más complejo, y por lo cual poco aplicado, en la práctica y otro general. En los sistemas biológicos se tienen las siguientes complicaciones para el control de sus procesos:



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

- i. Incertidumbre en cuanto a precisión de medidas
- ii. Dificultades en la determinación de los parámetros del modelo, que varían con el tiempo, y la temperatura, etc.
- iii. La incapacidad de medir varias variables de estado (como por ejemplo la concentración de *biomasa*)
- iv) Dificultades en modelar términos físicos con no linealidades (por ejemplo las cinéticas).

Las acciones básicas de controladores industriales las podemos clasificar en:

- i. De dos posiciones o de encendido y apagado (on-off)
- ii. Proporcionales
- iii. Proporcionales-Integrales
- iv. Proporcionales-Integrales-Derivativos

La necesidad de utilizar un controlador no lineal, se justifica por la capacidad de amortiguar muchas perturbaciones externas al sistema, además son más robustos en procesos con problemas de estabilidad y de comportamiento no lineal (Komives y Parker 2003). La temperatura, el pH y el oxígeno disuelto, son las variables más fáciles de medir y que sirven para controlar procesos (Alford 2006). Sin embargo, recientemente sólo las estrategias de control basados en modelos han sido eficientes para los procesos biológicos. Muchos trabajos sobre monitoreo en línea y control de bioprocesos son referidos a: observadores de estado, filtros y sensores virtuales basados en modelos. Estos estimadores utilizan la medición de algunas variables de estado en línea, y conjuntamente con el modelo matemático, permiten estimar de forma indirecta las variables no medibles e intentar conocer el vector de estados completo del sistema (Soroush 1998; De Assis et al. 2000; Goldberg 2000 y Dochain 2003). Métodos



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

lineales como los filtros de Kalman o el observador de Luenberger se utilizan para la estimación de parámetros cinéticos y rendimientos en línea, una de las desventajas es que la estabilidad y convergencia del observador, es válido solo en una pequeña región de operación (Bastin and Dochain 1990).

Se han desarrollado observadores no lineales, asintóticos, de alta ganancia, de modos deslizantes, etc., para la estimación de variables como: masa de células, sustrato y concentración de producto en bioprocesos (Biagola 2004; Aguilar et al. 2009).

En sistemas de sulfato reducción, se ha inferido la estimación de la concentración de biomasa y producto, bajo el supuesto de las mediciones de sustrato. La estructura del observador contiene, como es habitual, un término para la predicción dada por el modelo nominal más un término correctivo que retroalimenta las mediciones disponibles en el proceso. Existen observadores de tipo adaptable, donde la ganancia del observador correspondiente obedece a una ecuación dinámica propuesta, que proporciona alguna característica de convergencia específica, bajo el supuesto de ciertas suposiciones físicas del sistema. Otros trabajos presentan una nueva clase de controlador con una estructura polinomial del error de control, el controlador propuesto se aplica a una clase de quimiostato sulfato reductor con el fin de controlar la concentración de sulfato, lo que sería útil en el control de procesos para la remoción de metales pesados en aguas residuales. (Aguilar-López et al. 2009; Aguilar-López et al. 2010; Aguilar-López et al. 2008).

En este trabajo se propone desarrollar e implementar estructuras de modelado, simulación, estimación y control, que permitan predecir de forma indirecta la medición de variables de estado en tiempo real, así como un control parcial del proceso con el objetivo de establecer una mejora continua en la operación del biorreactor anaerobio de alta eficiencia para la remoción de Cd^{2+} mediante precipitación y adsorción en la biopelícula.



1.7 Justificación

Actualmente la industria biotecnológica y principalmente en el área de biorremediación necesita cumplir con estándares nacionales e internacionales de seguridad industrial y legislación ambiental, por lo que surge la necesidad de implementar sistemas de optimización eficientes en sus bioprocesos con un enfoque multidisciplinario.

1.8 Hipótesis de trabajo

El modelado, la estimación y control permitirán el diseño y operación óptimos para la remoción de cadmio en un sistema sulfato reductor (*Desulfovibrio alaskensis* 6SR).

1.9 Objetivos

General

Modelar, simular, estimar y controlar parcialmente variables de estado en un sistema sulfato reductor para la remoción de cadmio.

Objetivos específicos

- Determinar experimentalmente la capacidad de *Desulfovibrio alaskensis* 6SR, para la remoción de Cd^{2+} en un bioreactor anaerobio por lotes.
- Diseñar e implementar un modelo matemático representativo de *Desulfovibrio alaskensis* 6SR, para la remoción de Cd^{2+} basado en balances de materia.
- Estudiar de la dinámica a lazo abierto del modelo en operación en continuo para determinar regiones de máxima remoción de Cd^{2+}



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

- Desarrollar esquemas de observación y control robustos acordes al caso de estudio.
- Implementar, analizar y evaluar las propiedades de convergencia a lazo cerrado, mediante algoritmos implementados en un sistema virtual.

1.10 Estructura de la tesis.

La tesis está organizada de acuerdo al diagrama mostrado en la Figura 1.6. En el capítulo 1 se presenta el estado de arte de los procesos biotecnológicos con respecto a la remoción de cadmio utilizando sistemas anaerobios, así como ideas globales del modelado, simulación, estimación y control de bioprocesos. El capítulo 2 muestra la metodología experimental y teórica para cumplir con los objetivos propuestos. En el capítulo 3 se analizan y discuten los resultados obtenidos. En el capítulo 4 se presentan las conclusiones globales. El capítulo 5 se mencionan algunas recomendaciones como posibles casos de estudio. El capítulo 6 contiene todas las referencias de la tesis y por último tres anexos: anexo A referido a conceptos matemáticos fundamentales para el desarrollo de la tesis, anexo B referido a los algoritmos virtuales utilizados para las simulaciones en MATLAB® y por último el anexo C con los artículos aceptados.



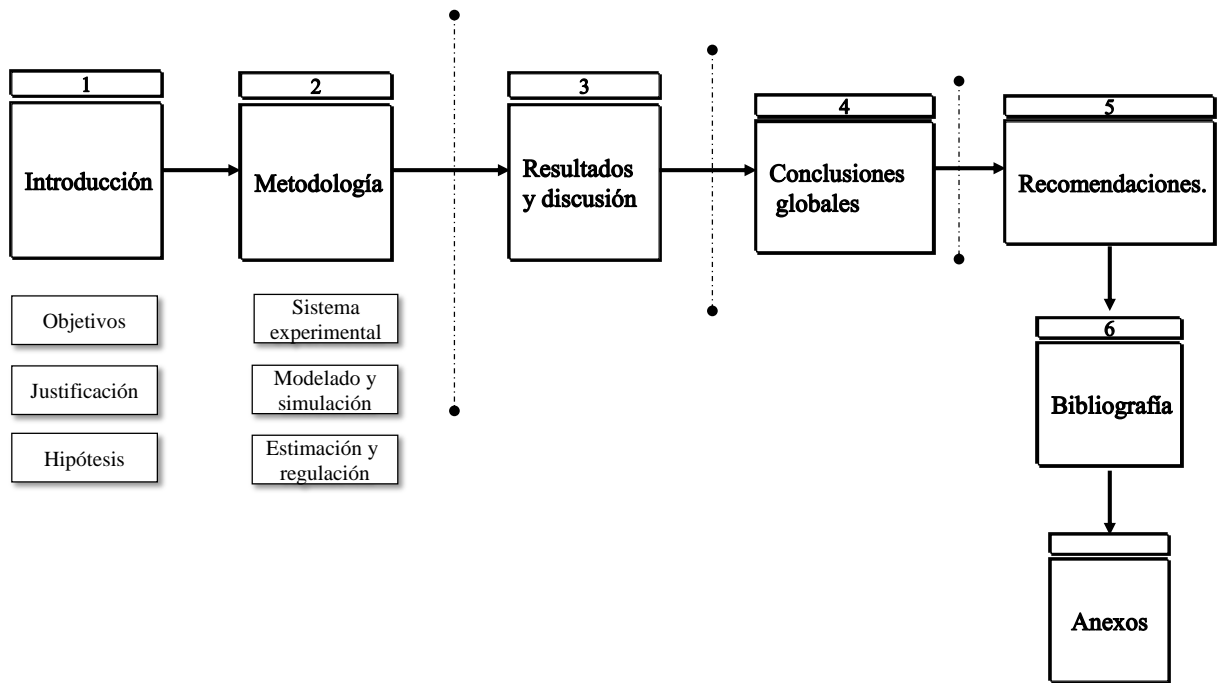


Figura1.6 Estructura de la tesis



Capítulo 2

Descripción de la metodología general



2.1 Etapa 1

Se realizó la parte experimental con base a la metodología presentada en la Etapa 1. El microorganismo *Desulfovibrio alaskensis* 6SR fue inoculado (10%) en botellas serológicas de 50 ml con medio Postgate C (Atlas, 1993), a un pH de 7 en condiciones anaerobias, adicionando 50, 100, 170 y 190 mg/L de cadmio y fue monitoreado cada 24 h, durante 230 h, por duplicado. Una botella se tomó cada 24 horas, de cada serie con diferente concentración inicial Cd^{2+} , y se analizó la contracción de: sulfato, sulfuro, biomasa, lactato, acetato, dióxido de carbono, y la concentración de cadmio, los métodos analíticos se presentan en el diagrama 1 (Cord-Ruwisch 1985; Kolmert et al. 2000; Postgate 1981).

2.2 Etapa 2

El diseño del modelo y su validación se describen en el diagrama 2. El modelo fue cuantificado a nivel extracelular mediante entradas y salidas. Para diseñar el modelo matemático fue necesario considerar cuatro sub-procesos con el objetivo de representar el sistema experimental.

- Respiración de la bacteria ^① (Hamilton et al. 1994; Matias et al. 2004),
- El consumo de la fuente de carbono lactato y acetato ^②,
- Formación de biopelícula ^③ (Wingender and Flemming, 1999),
- La distribución del metal en la biopelícula (*Chang et al., 2000; Elliott et al., 1998*) y en fase líquida ^④.

El modelo fue construido evaluando los diferentes modelos cinéticos no estructurados mostrados en la tabla 1.2 y 1.3, aplicando balances de materia. El ajuste de los parámetros cinéticos se realizó con el software Model Maker (rutina: **Levenberg-Marquardt**), bajo las siguientes condiciones iniciales: $S_0=5655$, $P_0: 50$, $X_0: 20$, $B_0: 0$, $\text{Cdl}: 170$, $\text{Cdb}: 0.1$, $L_0: 464$ y $A_0: 0.01$. Los valores iniciales de los parámetros se evaluaron de literatura como una **primera aproximación**; la optimización se terminó



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

una vez que el coeficiente de correlación fuera > 0.90 . Para la solución del sistema de ecuaciones diferenciales se utilizó el método numérico de Runge-Kutta (ode 23s y ode 45) de MATLAB®. Las estructuras cinéticas fueron seleccionadas en base al comportamiento experimental y el coeficiente de correlación.

2.3 Etapa 3

El modelo obtenido se utilizó para su aplicación en operación en continuo. En base a la metodología propuesta en el diagrama 3 se analizó la estabilidad y observabilidad de los diferentes estados estacionarios, correspondientes a la máxima remoción de cadmio.

2.4 Etapa 4-5

Por último se propusieron estructuras de control y estimación, esto con el objetivo regular y estimar la máxima remoción de Cd^{2+} . La metodología propuesta se presenta en el diagrama 4-5. La programación de los algoritmos para la implementación del estimador y controlador se presentan en el anexo B, estos algoritmos están basados en código de MATLAB®, además, se presenta un observador no lineal para llevar a cabo el proceso de estimación en el biorreactor. La convergencia de la metodología propuesta se analizó mediante la teoría de estabilidad de Lyapunov. Se realizaron experimentos numéricos con el fin de mostrar el comportamiento del observador propuesto y las propiedades de observabilidad. Cabe mencionar que el desarrollo del estimador se demuestra en esta tesis. Por el contrario, para la ley de control no lineal que contiene una retroalimentación sigmoideal del error de control, con el fin de controlar la concentración de sulfuro en el valor máximo que conduce indirectamente a regular la concentración de cadmio, cumpliendo con normativas ambientales, para más detalles revisar el anexo C.



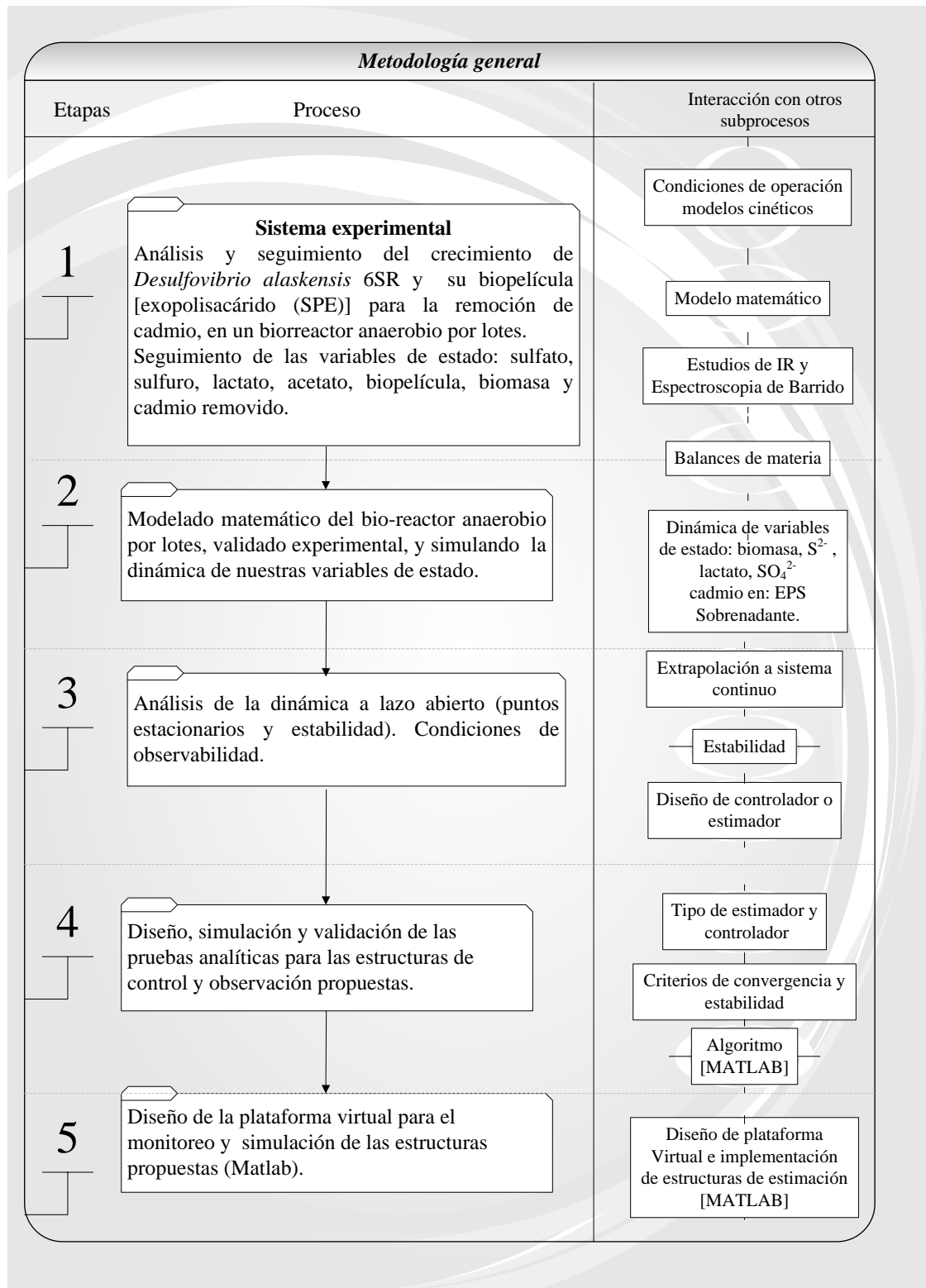


Diagrama 1 Procedimiento para la determinación de parámetros cinéticos y rendimientos en la remoción de Cd^{2+} vía *Desulfovibrio alaskensis 6SR*, en un sistema anaerobio por lotes.

Interacción

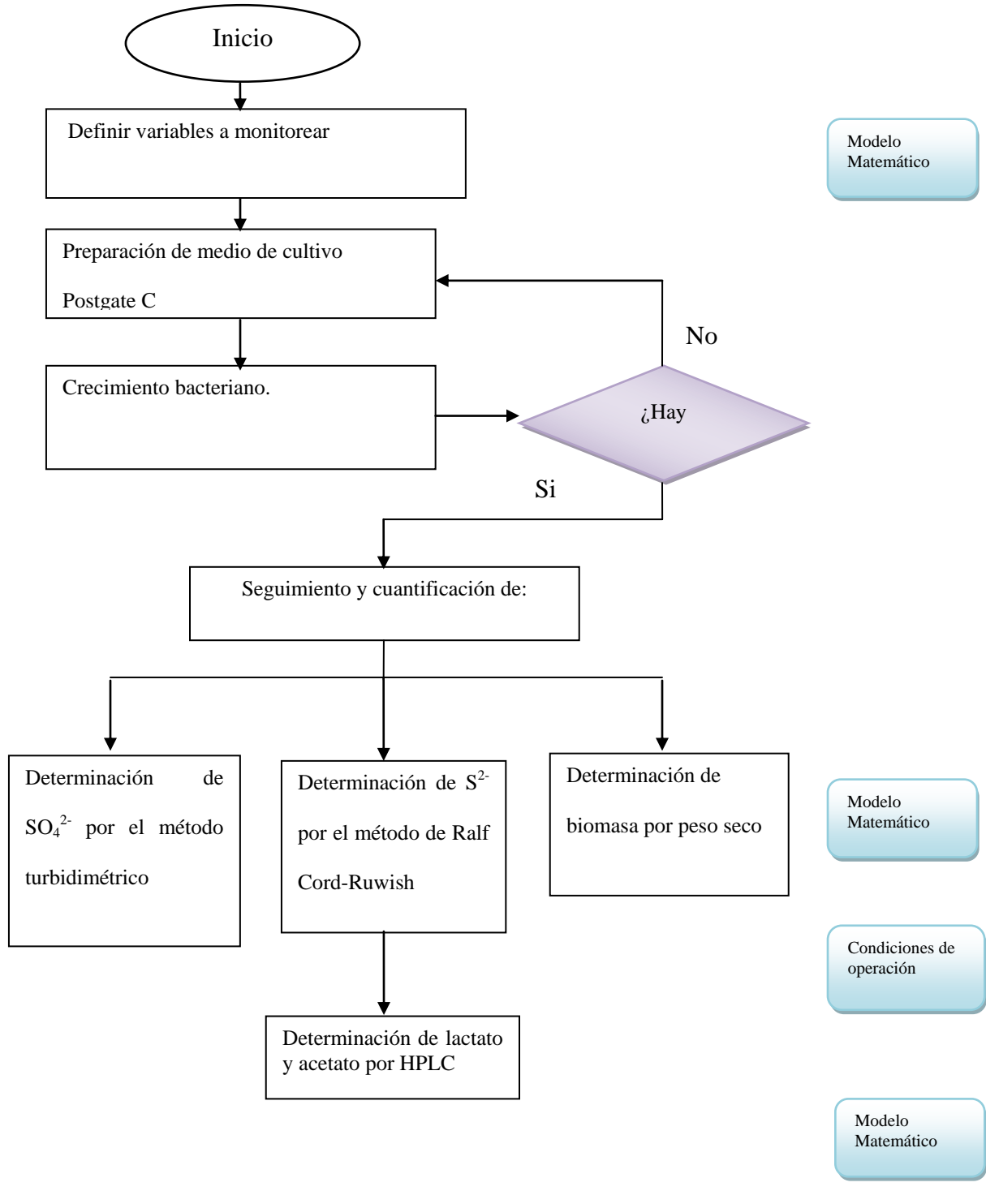


Diagrama 1 Procedimiento para la determinación de parámetros cinéticos y rendimientos en la remoción de Cd^{2+} vía *Desulfovibrio alaskensis 6SR*, en un sistema por lotes. Interacción

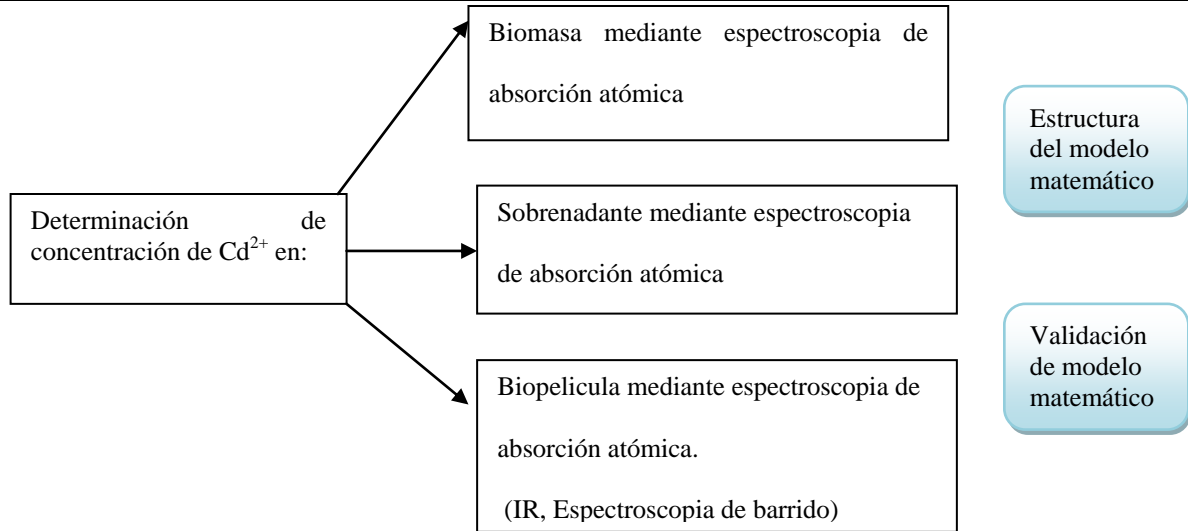


Diagrama 2 Procedimiento para la diseño del modelo matemático y ajuste de parámetros cinéticos para la remoción de cadmio

Interacción

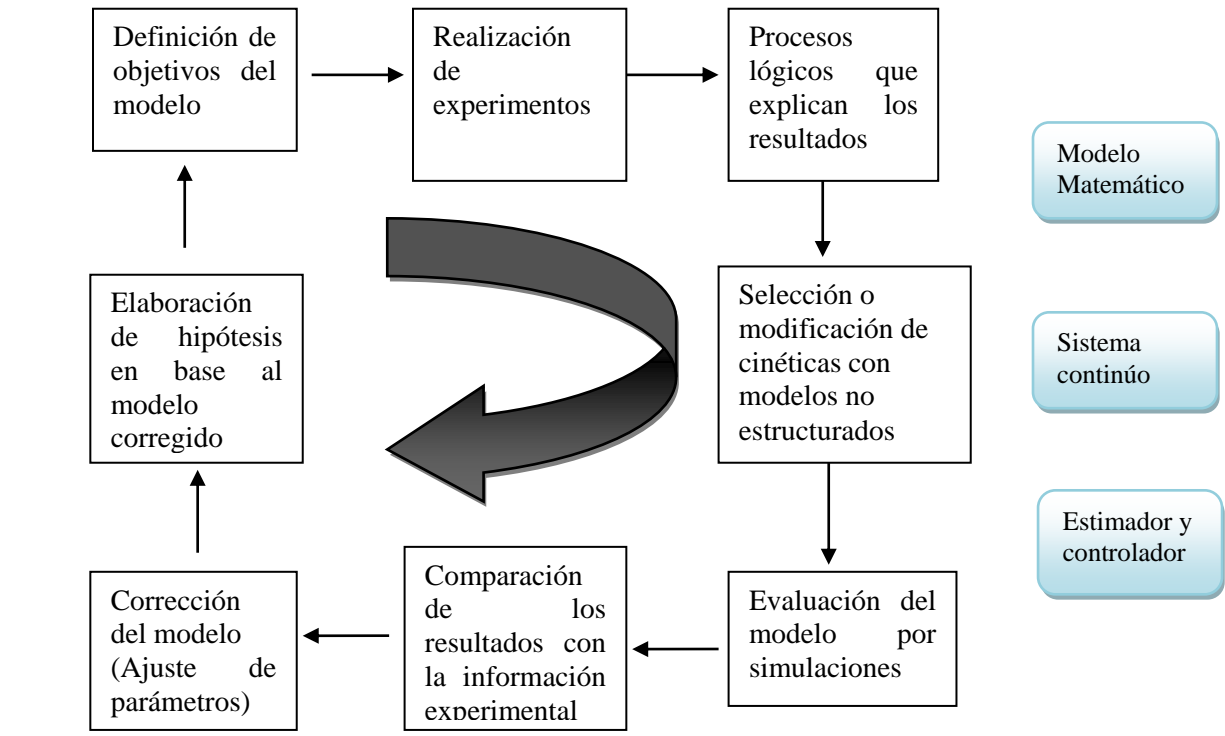


Diagrama 3 Aplicación a sistema continuo, condiciones de estabilidad y observabilidad.

Interacción

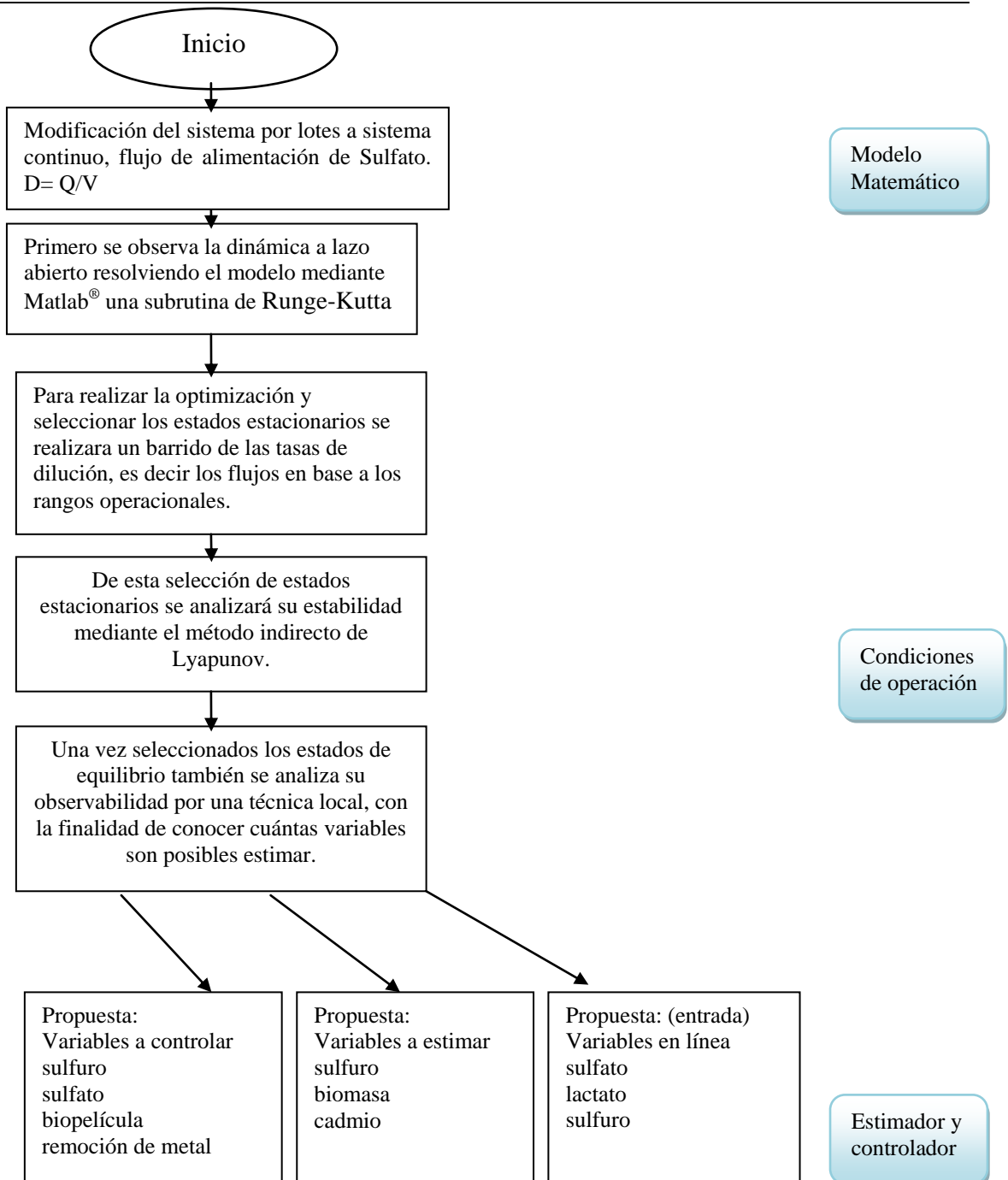
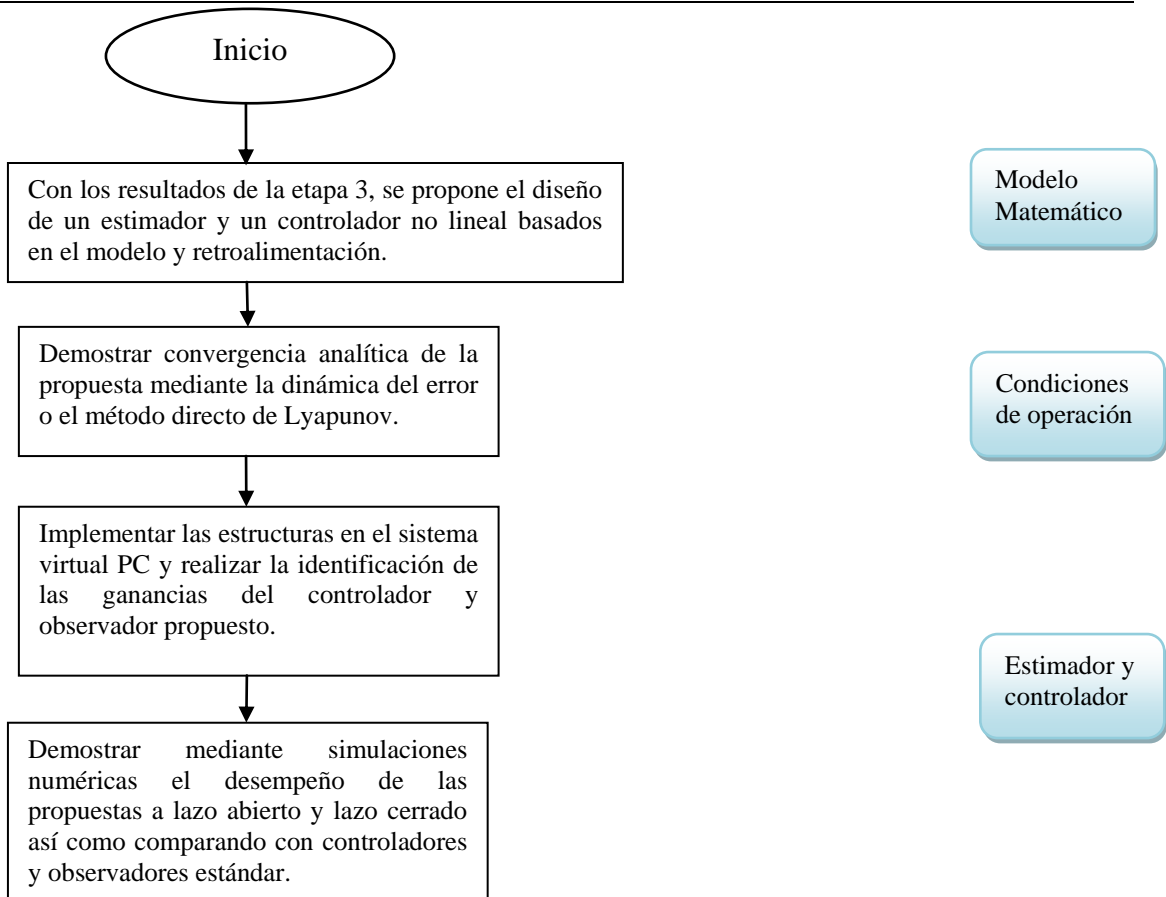


Diagrama 4-5 Implementación y pruebas analíticas de las estructuras propuestas

Interacción



Capítulo 3

Resultados y discusión



3.1 Concentración mínima inhibitoria

Se realizó la parte experimental con base a la metodología presentada en la Etapa 1. El microorganismo *Desulfovibrio alaskensis* 6SR presentó crecimiento en ausencia y presencia de Cd^{2+} en un rango de 0 a 170 mg/L, no así a concentraciones mayores de 170 mg/L, como se muestra en la tabla 1.5. La concentración mínima inhibitoria (MIC) permite encontrar la concentración de crecimiento de la bacteria en presencia de un agente tóxico, en este caso la concentración de Cd^{2+} .

Tabla 1.5 Concentración mínima inhibitoria

MIC [Cadmio en mg/L]	Crecimiento(λ_{580})
0	0.226
150	0.378
170	0.378
190	0.109
300	0.05

3.2 Cinética de remoción de cadmio

Los resultados del crecimiento bacteriano en presencia del ion cadmio con respecto al control se presentan en la Figura 1.7. La actividad de la sulfato reducción fue afectada ligeramente por la concentración de cadmio, como se observa en la Figura 1.7. Después de 120 h (5 días) aproximadamente el 89% de sulfato fue consumido y la máxima producción de sulfuro hidrógeno fue de aproximadamente 550 mg/L en ambos cultivos (véanse las Figuras 1a), b)). En el caso de la



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

concentración de biomasa, esta fue mayor que la del cultivo de control después de 24 horas (Figura 1c)).

En general, una alta concentración de cadmio en solución provoca una disminución en la tasa de la sulfato reducción afectando la precipitación del metal, sin embargo, esto no se observó para *D. alaskensis* 6SR. Este hecho se puede atribuir a que los cultivos se iniciaron con células jóvenes en su máxima tasa reproductiva, además, las células no se lavaron, como en otros estudios reportados (Cabrera et al. 2006, Klonowska et al. 2008). Reis et al. (2002) y Rivera et al. (2003) mencionan que la transformación de sulfato a sulfuro se inhibió en un 50% de consumo de sulfato a una concentración de 480 mg/L de sulfuro de hidrógeno, mientras que la inhibición completa se produjo a 547 mg/L, por lo que nuestros resultados son similares a los reportados en literatura (Moosa et al. 2002, Oyekola et al. 2010, Sani et al. 2001, Al-Zuhair et al. 2008). Además, el pH del medio se midió durante el crecimiento bacteriano y al final de los experimentos, el pH fue alcalino (8.3).

La Fig. 1.8 muestran la evolución en el tiempo correspondiente a las concentraciones de: lactato, acetato y formación biopelícula. La oxidación máxima de lactato fue del 94%, correspondiente a una producción de acetato de 3500 mg/L, con un error experimental estequiométrico del 5% (Nandasana y Kumar, 2008). Otra característica importante fue la producción inmediata de sustancias poliméricas extracelulares (SPE). La producción de SPE por microorganismos es definido como un mecanismo clave para facilitar la adhesión celular y el desarrollo de biopelículas. Sin embargo, también funciona como un mecanismo de protección de las células contra sustancias tóxicas (por ejemplo, metales pesados, H₂S). La formación de biopelícula se alcanzó a las 72 horas con una concentración promedio de 1900 mg/L (Fig. 1.8 b)).



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Basándose en los resultados experimentales, *Desulfovibrio alaskensis* 6SR puede ser una bacteria con un gran potencial para la remoción de cadmio (170 mg/L) en comparación con los sistemas fisicoquímicos y otros microorganismos, incluyendo especies del mismo género, (Arakaki et al. 2002, Naz et al. 2005). Aunque, *D. alaskensis* 6SR es una bacteria anaerobia, lo que podría ser un inconveniente para su cultivo y manipulación, esto presenta un gran ventaja en el sentido que en un cultivo anaerobio se produce poca biomasa y su mecanismo simple de remoción, permite una fácil recuperación de sulfuro de cadmio. *D. alaskensis* 6SR fue capaz de remover el 99.9% del cadmio en el concentración ensayada (170 mg / L). La concentración de cadmio en la fase líquida y la biopelícula se presenta en la Figura 1.9. Por otra parte, la Fig. 1.9 a) muestra la variación de la concentración de Cd^{2+} en solución.

El Cd^{2+} fue retirado casi por completo en las primeras 72 horas. *D. magneticus* puede precipitar más del 95% de cadmio de una concentración inicial de 1.3 mg/L (Arakaki et al. 2002). Otros microorganismos, como *Azomonas agilis* PY101, eliminan aproximadamente el 90% de cadmio en una agua residual artificial que contiene 1 mM CdCl_2 (112 mg/L) (Sinha y Mukherjee 2009, Wang et al. 1997).

En general, las concentraciones de remoción de cadmio por BSR no superan 100 mg/L, mientras que *D. alaskensis* 6SR tiene la capacidad de tolerar y remover hasta 170 mg/L de cadmio.

De acuerdo con Tchobanoglous y Burton, (1991), en presencia de BSR la remoción de metales pesados no sólo puede tener lugar por la precipitación de sulfuros, se pueden dar también a través de biosorción en la biopelícula. Además, en nuestro trabajo, la remoción de Cd^{2+} fue a través de la precipitación y acumulación en la biopelícula, siendo estos dos procesos los mecanismos principales.



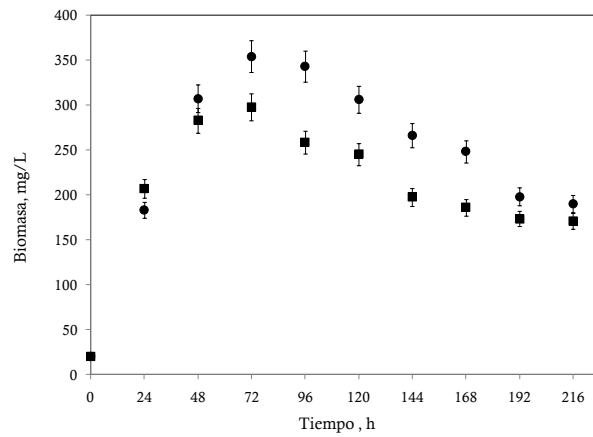
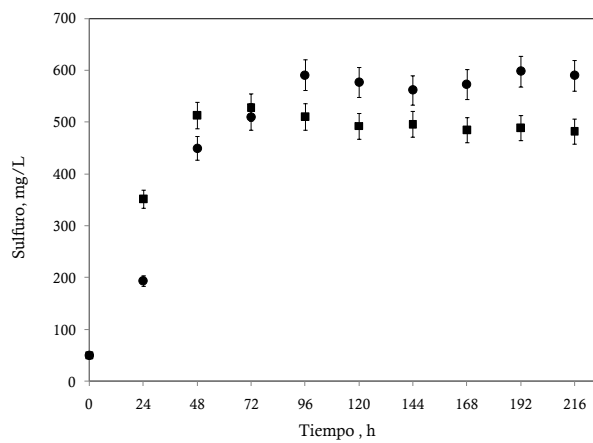
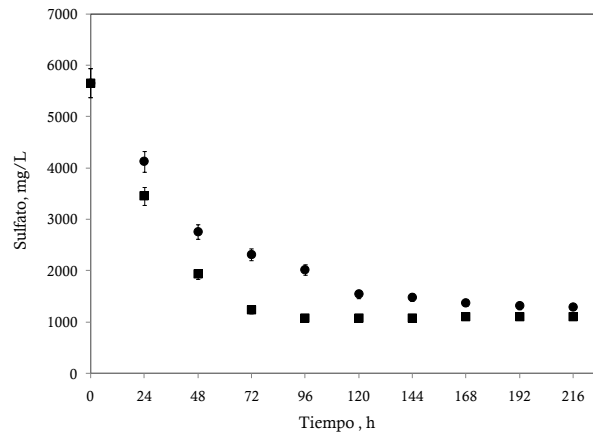


Figura 1.7 Comportamientos de la reducción de sulfato: a) sulfato b) sulfuro y c) biomasa, sin metal [■] y con metal [●], con una concentración inicial de cadmio de 170 mg/L en condiciones anaerobias.



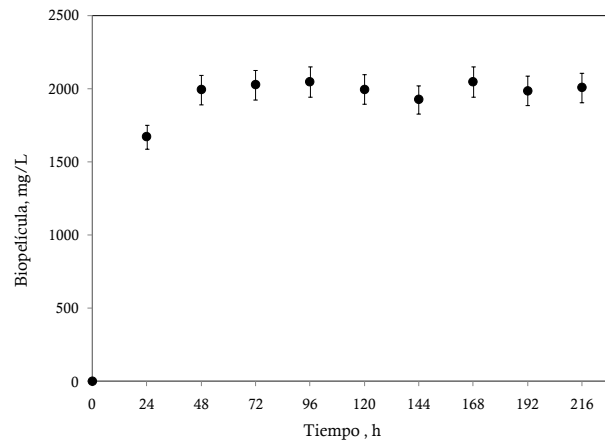
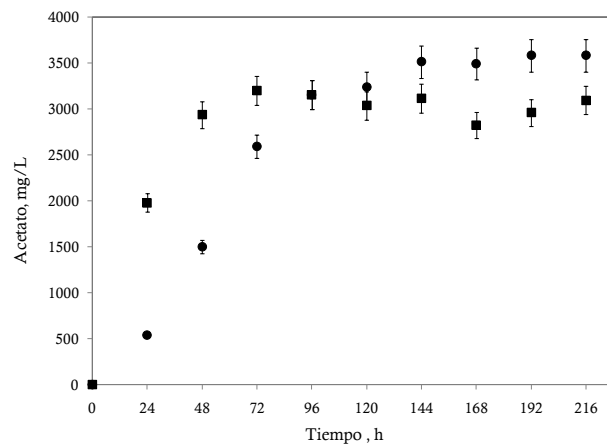
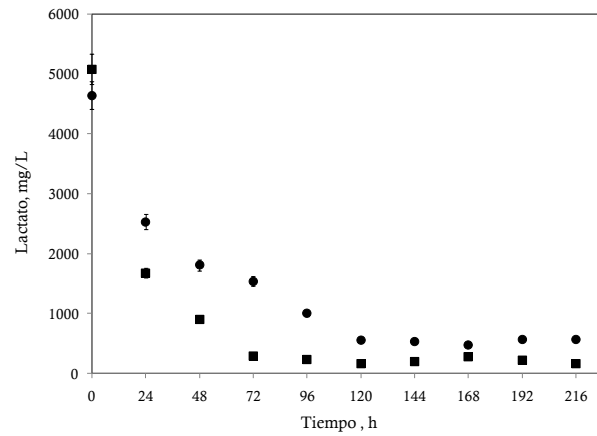


Figura 1. 8 Comportamientos de la oxidación de la fuente de carbono y producción de biopelícula (EPS-Biomasa): a) lactato, b) acetato y c) biopelícula, [■] sin metal y con metal [●].



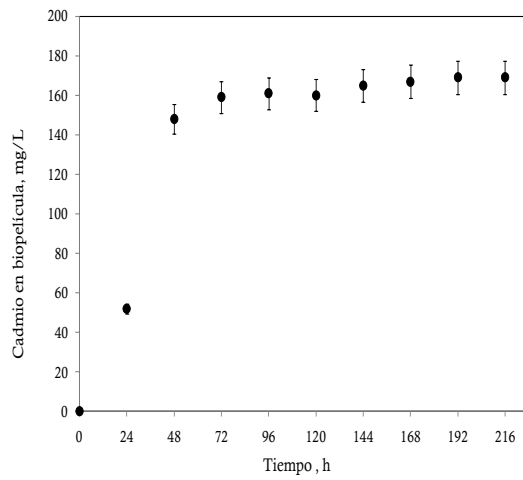
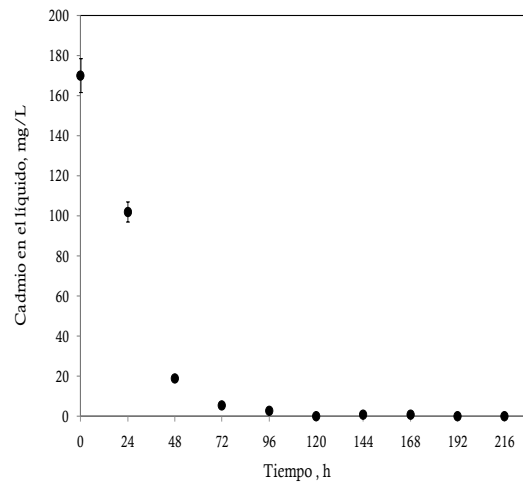


Figura 1. 9 Comportamientos de la distribución de cadmio: a) líquido y b) biopelícula, con una concentración inicial de cadmio de 170 mg/L en condiciones anaerobias.



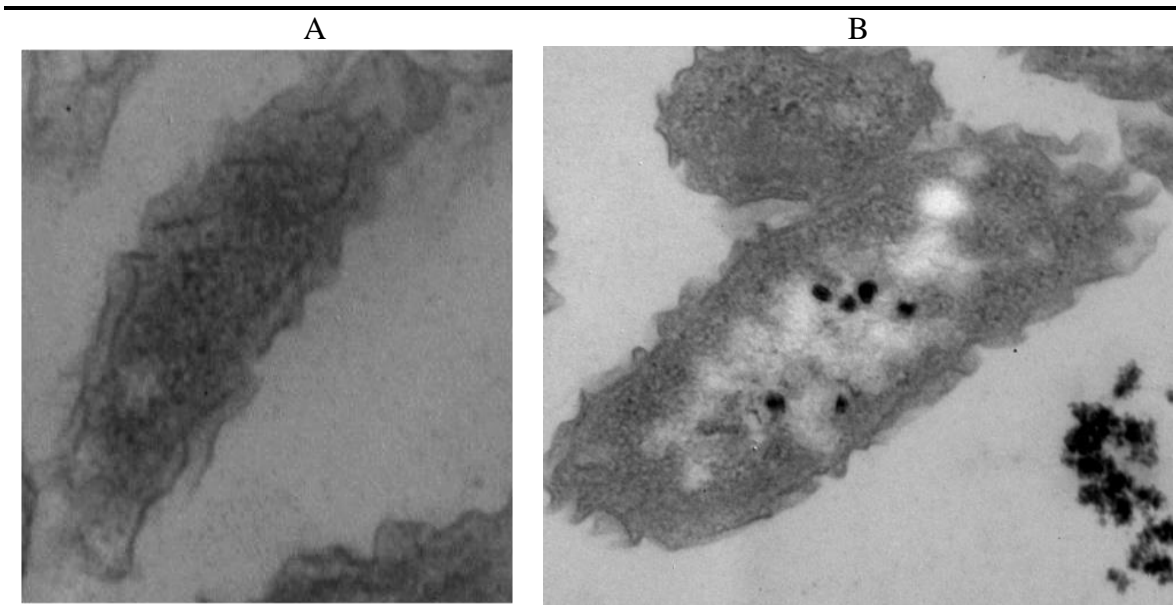


Figura 1.10 Representación microscópica de los mecanismos de reacción (*Desulfovibrio alaskensis* 6SR en presencia de Cd^{2+} 170 mg/L- 96 h, 100 nm AMT Camara system)

Un análisis de Microscopio electrónico de barrido (SEM) fue realizado para evaluar la acumulación de cadmio en las células. La coloración amarilla de la biopelícula fue un claro indicador del sulfuro de cadmio adsorbido. Este hecho se analizó mediante SEM, las micrografías mostraron evidencia de acumulación de cadmio en la biopelícula y una estructura diferente en contraste con el control (vea la Figura 1.10). La célula se cosechó a 96 h de incubación por centrifugación (10 000 g durante 10 minutos a 5 ° C). Las pruebas de microscopía electrónica de *D alaskensis* 6SR mostró la acumulación de cadmio en forma de la CdS dentro de las células así como en la unión a proteínas extracelulares. Además, la precipitación de los metales pesados es un evento rápido que ocurre después de las primeras horas, el secuestro de sulfuro de cadmio en forma de precipitado en la biopelícula es una función del EPS y la producción de biomasa, la interacción es entre la carga del metal y los grupos terminales de la célula y del exopolisacárido (Beech y Cheung, 1995; Zinkevich et al. 1996), en este



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

tipo de bacterias los polisacáridos se forman principalmente a partir de monómeros básicos, como la manosa, glucosa, xilosa y la ribosa.

Teniendo en cuenta que la remoción máxima de metal fue a una concentración inicial de 170 mg /L de Cd^{2+} (99.9%), el modelo matemático propuesto fue diseñado y después ajustado a esta concentración con fines de control y estimación en operación en continuo manteniendo condiciones de máxima remoción de Cd^{2+} .

3.3 Diseño y simulación del modelo.

El modelo diseñado esta descrito por ocho ecuaciones diferenciales no lineales acopladas, las estructuras cinéticas seleccionadas son: modelo de *Levenspiel modificado* (respiración de la bacteria), modelo de *Moser- Boulton modificado* (consumo de la fuente de carbono), modelo de *Monod-Loung modificado* (producción de biopelícula), modelo de *Levenspiel- Haldane modificado* (remoción del metal en la biopelícula y sobrenadante).

Consideraciones:

- i) Reactor por lote $D = 0$ ii) Reactor continuo $D \neq 0$

D: tasa de dilución

Modelo matemático en continuo

Balance de concentración de sulfato (S):

$$\frac{dS}{dt} = D(S_{in} - S) - \frac{k_{max.spx}}{Y} \left(1 - \frac{P}{k_p}\right)^\alpha \left[\frac{S}{k_s + S}\right] X L^\varepsilon \quad (6)$$

Balance de concentración de sulfuro (P):

$$\frac{dP}{dt} = -DP + \frac{k_{max.spx}}{Y_p} \left(1 - \frac{P}{k_p}\right)^\alpha \left[\frac{S}{k_s + S}\right] X L^\varepsilon \quad (7)$$

Balance de concentración de biomasa (X):



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

$$\frac{dX}{dt} = -DX + k_{max\text{sp}x} \left(1 - \frac{P}{k_p}\right)^\alpha \left[\frac{S}{k_s + S}\right] \left[\frac{Cdl^{2+}}{k_{Cdl} + Cdl^{2+}}\right]^\eta X L^\varepsilon - k_d X L^\varepsilon \quad (8)$$

Balance de concentración de lactato (L):

$$\frac{dL}{dt} = D(L_{in} - L) - k_{max\text{LA}} Y_{L/X} \left[\frac{k_{ace}}{A + k_{ace}}\right] \left[\frac{L^\delta}{k_{lac} + L^\delta}\right] X \quad (9)$$

Balance de concentración de acetato (A):

$$\frac{dA}{dt} = -DA + k_{max\text{LA}} Y_{A/X} \left[\frac{k_{ace}}{A + k_{ace}}\right] \left[\frac{L^\delta}{k_{lac} + L^\delta}\right] X \quad (10)$$

Balance de concentración de biopelícula (B):

$$\frac{dB}{dt} = -DB + k_{max\text{bio}} \left(1 - \frac{B}{k_B}\right)^\beta \left[\frac{S^\theta}{k_s + S^\theta}\right] X L \quad (11)$$

Balance de concentración de cadmio en el líquido (Cdl):

$$\frac{dCdl}{dt} = D(Cdl_{in} - Cdl) - k_{max\text{Cdl}} \left(1 - \frac{P}{k_p}\right)^\gamma \left[\frac{Cdl}{k_1 + Cdl + \frac{Cdl^2}{k_2}}\right] X B \quad (12)$$

Balance de concentración de cadmio en el biopelícula (Cdb):

$$\frac{dCdb}{dt} = DCdb - k_{max\text{Cdl}} \left(1 - \frac{P}{k_p}\right)^\gamma \left[\frac{Cdl}{k_1 + Cdl + \frac{Cdl^2}{k_2}}\right] X B \quad (13)$$

El ajuste del modelo propuesto permitió obtener 23 parámetros del modelo desarrollado. La identificación paramétrica se ilustra mediante los coeficientes de correlación por encima de 0.95 entre los valores experimentales y los simulados por el modelo. Los valores de los parámetros obtenidos en el presente estudio son diferentes a los reportados en literatura, esto puede ser debido a las diferentes condiciones de funcionamiento utilizadas en cada caso, es decir; la presencia o ausencia de metal, fuente de carbono diferente, la operación continua o por lotes, la temperatura, el pH, entre otros



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

(Moosa et al. 2002, Al-Zuhair et al. 2008, Kaksonen et al. 2004, Oyekola et al. 2010). La tasa máxima de crecimiento específico obtenida fue de 0.133 h^{-1} , que es muy similar al obtenido (0.13 h^{-1}) por Feio et al. (2004). La constante de inhibición (k_p) determinada en este trabajo es de 680 mg/L . Por último, el modelo cinético se simuló considerando un proceso en operación continua con diferentes concentraciones iniciales Cd^{2+} : 50, 100, 170, 190, y 300 mg/L . La máxima concentración de Cd^{2+} removido fue de 169 mg/L a una concentración inicial de Cd^{2+} 170 mg/L y una $D = 0.01 \text{ h}^{-1}$ (tiempo de residencia de 4.1 d) en operación en continuo.

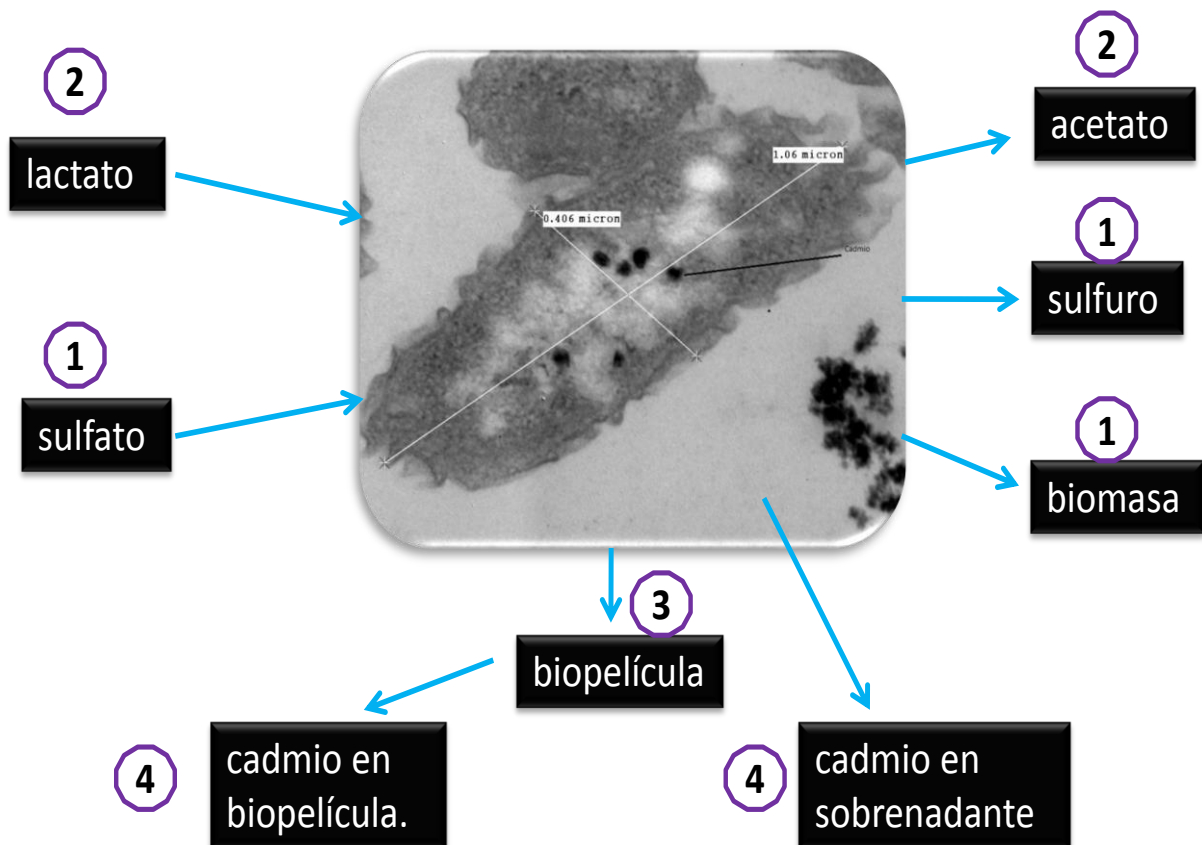


Figura 1.11 Comportamientos de la distribución de cadmio (*Desulfovibrio alaskensis* 6SR en presencia de Cd^{2+} (170 mg/L) para un tiempo de 72 h, 100 nm AMT Camara system)



3.4 Observador propuesto

Por otra parte, un observador no lineal fue propuesto, este observador garantiza que el error de estimación converge asintóticamente a cero cada vez que la ganancia del observador sea elegida adecuadamente. Con el modelo en continuo se propone un análisis de observabilidad local para el seguimiento de variables clave en la operación del biorreactor anaerobio.

3.4.1 Análisis de observabilidad

Los resultados de las simulaciones numéricas para el análisis de estabilidad y observabilidad sobre regiones de operación para la máxima remoción de Cd^{2+} en la fase líquida (Cdl) en operación continua se muestran en la Tabla 1.6. Se analizó el efecto de la tasa de dilución para remover la mayor cantidad de cadmio en el líquido (por ejemplo, $D = 0.01 \text{ h}^{-1}$; $\text{Cdl} = 0.069 \text{ mg/L}$, $D = 0.015 \text{ h}^{-1}$; $\text{Cdl} = 0.069 \text{ mg/L}$ y $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$; $\text{Cdl} = 12.85 \text{ mg/L}$). El sistema es observable si y sólo si la matriz de observabilidad es de rango completo (Dochain y Chen, 1992), por lo tanto, el sistema (6-13) no es completamente observable y presenta un máximo de cinco variables de estado a estimar, por ejemplo; si la concentración de sustrato es la salida medible (inciso 1, de la tabla 1.6), las variables observables son: sulfato, biomasa, cadmio en líquido, acetato, y dióxido de carbono, por lo tanto, las variables no observables son: sulfuro, biomasa, cadmio en biopelícula y lactato, en otro caso, si la biopelícula y el dióxido de carbono se consideran como las salidas medibles (inciso 10, de la tabla 1.6), las variables observables son: sulfato, sulfuro, biopelícula, acetato, cadmio en biopelícula y el dióxido de carbono, las variables no observables son: cadmio en líquido, lactato, y la biomasa (véase, la Tabla. 1.6). Se ha encontrado que para todos los conjuntos considerados, la matriz de observabilidad no es de rango completo, por lo tanto, un observador Luenberger se compara con la estructura propuesta con el fin de mostrar su desempeño, con las siguientes condiciones iniciales para la planta virtual y los



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

observadores:

$$x_0 = [5655 \ 29 \ 20 \ 0170 \ 0.014640 \ 0.10.1]^T \quad \hat{x}_0 = [5680 \ 20 \ 38 \ 0175 \ 0.14240 \ 0.099]^T$$

Tabla 1.6 Análisis de estabilidad y observabilidad

Punto de equilibrio considerado:					
$x_{eq} = [2348, 444, 248, 1903, 0.069, 169, 1470, 2536, 654]^T \text{ mg/L}$					
Valores propios:					
$\lambda = [-0.0141, -23.26, -0.022, -0.0228 + 0.01i, -0.0228 - 0.01i, -0.035, -0.01, -0.01, -0.01]^T$					
$D = 0.01h^{-1}$					
1)	$C = [1000000000]^T$ $rango(O) = 5$	4)	$C = [0001000000]^T$ $rango(O) = 4$	7)	$C = [000000100]^T$ $rango(O) = 4$
2)	$C = [0100000000]^T$ $rango(O) = 4$	5)	$C = [0000100000]^T$ $rango(O) = 2$	8)	$C = [000000010]^T$ $rango(O) = 4$
3)	$C = [0010000000]^T$ $rango(O) = 4$	6)	$C = [0000010000]^T$ $rango(O) = 2$	9)	$C = [000000001]^T$ $rango(O) = 5$
Combinación de mediciones					
10)	$C = [0001000001]^T$ $rango(O) = 6$	11)	$C = [1100000000]^T$ $rango(O) = 4$	12)	$C = [000000011]^T$ $rango(O) = 5$

3.4.2 Prueba de estabilidad del observador

Vamos a desarrollar la estructura general de observadores de estado. Considerando la siguiente representación de sistema no lineal (modelo obtenido de la parte experimental ecuaciones 6-13):

$$\dot{x} = f(x, u) \quad (14)$$

$$y = Cx \quad (15)$$

Dónde: $y \in \mathfrak{R}^m$ es el vector de salida (mediciones) $x \in \mathfrak{R}^n$ el vector de variables de estado



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

$f(\circ): \mathfrak{R}^n \times \mathfrak{R}^q \rightarrow \mathfrak{R}^n$ es un función no lineal suave, Lipschitz en x y acotada uniformemente en u ,
 $u \in \mathfrak{R}^q$

La estructura general de un observador de estado para el sistema (14-15) es:

Usualmente se requiere que $\|\hat{x} - x\| \rightarrow 0$, as $t \rightarrow \infty$ (Gauthier et al., 1992).

Proposición 1. El sistema dinámico que sigue el observador es:

$$\dot{\hat{x}} = \hat{f}(\hat{x}, u, y) + k^{-1} \left(\frac{e}{\sqrt{1+e^2}} \right) \quad (16)$$

Dónde: $e = x - \hat{x}$

Prueba de convergencia de la proposición 1

El objetivo de un observador de estado es proporcionar una estimación precisa de las variables de estado que no se miden. En la práctica, hay un error de estimación que se define por la diferencia entre el estado estimado y el estado real, definiendo la dinámica del error de observación de la siguiente manera:

$$\dot{e} = f(x, u) - \hat{f}(\hat{x}, u) + k^{-1} \left(\frac{e}{\sqrt{1+e^2}} \right) \quad (17)$$

Dónde:



$$\begin{aligned}
 f(x, u) = & \left[\begin{array}{l}
 D(S_{in} - S) - \frac{k_{spX}}{Y} \left(1 - \frac{P}{k_p}\right)^\alpha \left[\frac{S}{k_s + S}\right] X L^\varepsilon \\
 - DP + \frac{k_{spX}}{Y_p} \left(1 - \frac{P}{k_p}\right)^\alpha \left[\frac{S}{k_s + S}\right] X L^\varepsilon \\
 - DX + k_{spX} \left(1 - \frac{P}{k_p}\right)^\alpha \left[\frac{S}{k_s + S}\right] \left[\frac{Cdl}{k_{Cdl} + Cdl}\right]^\eta X L^\varepsilon - k_d X L^\varepsilon \\
 D(L_{in} - L) - k_{LA} Y_{L/X} \left[\frac{k_{ace}}{A + k_{ace}}\right] \left[\frac{L^\delta}{k_{lac} + L^\delta}\right] X \\
 - DA + k_{LA} Y_{L/X} \left[\frac{k_{ace}}{A + k_{ace}}\right] \left[\frac{L^\delta}{k_{lac} + L^\delta}\right] X \\
 - DI + k_{co} Y_{I/X} \left[\frac{k_I}{A + k_I}\right] \left[\frac{L^\delta}{k_{lac} + L^\delta}\right] X \\
 - DB + k_{bio} \left(1 - \frac{B}{k_B}\right)^\beta \left[\frac{S^\theta}{k_s + S^\theta}\right] X L \\
 D(Cdl_{in} - Cdl) - k_{Cdl} \left(1 - \frac{Cdb}{k_{Cdb}}\right)^\gamma \left[\frac{Cdl}{k_1 + Cdl + \frac{Cdl^2}{k_2}}\right] X B \\
 - Cdb + k_{Cdl} \left(1 - \frac{Cdb}{k_{Cdb}}\right)^\gamma \left[\frac{Cdl}{k_1 + Cdl + \frac{Cdl^2}{k_2}}\right] X B
 \end{array} \right] \quad (18)
 \end{aligned}$$

$$x = [S, P, X, L, A, I, B, Cdl, Cdb]^T \in \mathfrak{R}_+^9$$

Usando las desigualdades del triángulo y Cauchy –Schwarz en la expresión (17) tenemos:

A1.

$$|f(x, u) - \hat{f}(\hat{x}, u)| \leq L|x - \hat{x}| \text{ Lipschitz } L > 0 \quad (19)$$

A2.



$$\left| \frac{e}{\sqrt{1+e^2}} \right| \leq 1 \quad (20)$$

Considerando una función de Lyapunov candidata;

$$V = e^T Q e = \|e\|_Q^2, Q = Q^T > 0 \quad (21)$$

Derivando la función a lo largo de las trayectorias tenemos:

$$\dot{V} = \dot{e}^T Q e + e^T Q \dot{e} \quad (22)$$

$$\dot{V} = \left(f(x,u) - \hat{f}(\hat{x},u) + k^{-1} \left(\frac{e}{\sqrt{1+e^2}} \right) \right)^T Q e + e^T Q \left(f(x,u) - \hat{f}(\hat{x},u) + k^{-1} \left(\frac{e}{\sqrt{1+e^2}} \right) \right) \quad (23)$$

$$\dot{V} = 2e^T Q \left(f(x,u) - \hat{f}(\hat{x},u) \right) - 2e^T k^{-1} \left(\frac{e}{\sqrt{1+e^2}} \right) \quad (24)$$

(a) La matriz Q puede ser expresada como $Q = MM^T$, así tenemos

$$\|e^T Q (f(x,u) - \hat{f}(\hat{x},u))\| = \|e^T M M^T (f(x,u) - \hat{f}(\hat{x},u))\| = \|\tilde{e}^T \tilde{f}\| \quad (25)$$

Donde, $\tilde{e}^T = e^T M$ y $\tilde{f} = M^T (f(x,u) - \hat{f}(\hat{x},u))$

Entonces,

$$\|\tilde{e}^T\| = (\tilde{e}^T \tilde{e})^{1/2} \quad (26)$$

$$\|\tilde{e}^T\| = (e^T M M^T e)^{1/2} \quad (27)$$

$$\|\tilde{e}^T\| = (e^T Q e)^{1/2} = \|e\|_Q \quad (28)$$

Ahora bien podemos definir de la misma manera:

$$\|\tilde{f}\| = \|f\|_p \quad (29)$$

$$\|e^T Q (f(x,u) - \hat{f}(\hat{x},u))\| = \|\tilde{e}^T \tilde{f}\| \leq \|\tilde{e}^T\| \|\tilde{f}\| = \|e\|_Q \|f\|_Q \quad (30)$$

b) Considerando (a)



$$\left\| e^T Q k^{-1} \left(\frac{e}{\sqrt{1+e^2}} \right) \right\| \leq \|e\|_Q k^{-1} \left\| \frac{e}{\sqrt{1+e^2}} \right\| \quad (31)$$

De (a) y (b),

$$\dot{V} \leq 2 \left[\|e\|_Q L \|e\|_Q + k^{-1} \|e\|_Q \right] \quad (32)$$

$$\dot{V} \leq 2 \left[L \|e\|_Q^2 + k^{-1} \|e\|_Q \right] \quad (33)$$

Ahora considerando la función de Lyapunov sobre la dinámica del error de estimación se desarrolla la siguiente desigualdad:

$$2 \|e\|_Q \frac{d}{dt} \|e\|_Q \leq 2 \left[L \|e\|_Q^2 + k^{-1} \|e\|_Q \right] \quad (34)$$

$$\frac{d}{dt} \|e\|_Q \leq L \|e\|_Q + k^{-1} \quad (35)$$

Finalmente resolviendo la desigualdad (35):

$$\|e\|_Q \leq \|e\|_{Q0} \exp(-Lt) + \frac{k^{-1}}{L(1 - \exp(-Lt))} \quad (36)$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \|e\|_Q \leq \frac{k^{-1}}{L} \quad (37)$$

Si se considera $k \gg 0$ El error de estimación se puede hacer muy pequeño.

Con fines de aplicación, la concentración de sulfato se considera como la salida medible de los observadores lo cual se justifica porque esta concentración es una de las variables más fácil de medir en el biorreactor. Con el fin de demostrar la robustez del observador bajo perturbaciones, se supone que el reactor es operado en el modo semi-continuo, con tasas de dilución que varían entre $D = \{0, 0.01, 0.1 \text{ h}^{-1}\}$ como se muestra en la figura 1.12. El observador propuesto proporcionar buena estimación del sulfato, biomasa, cadmio en líquido, acetato, y dióxido de carbono (Fig. 1.12), puede verse que el error de estimación del observador Luenberger es más grande que la del observador propuesto, la ganancia del observador es $k = 51 \text{ h}^{-1}$, se consideró la misma para los dos observadores.



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Las trayectorias de la metodología propuesta convergen rápidamente a las trayectorias reales, que no es el caso del observador Luenberger.

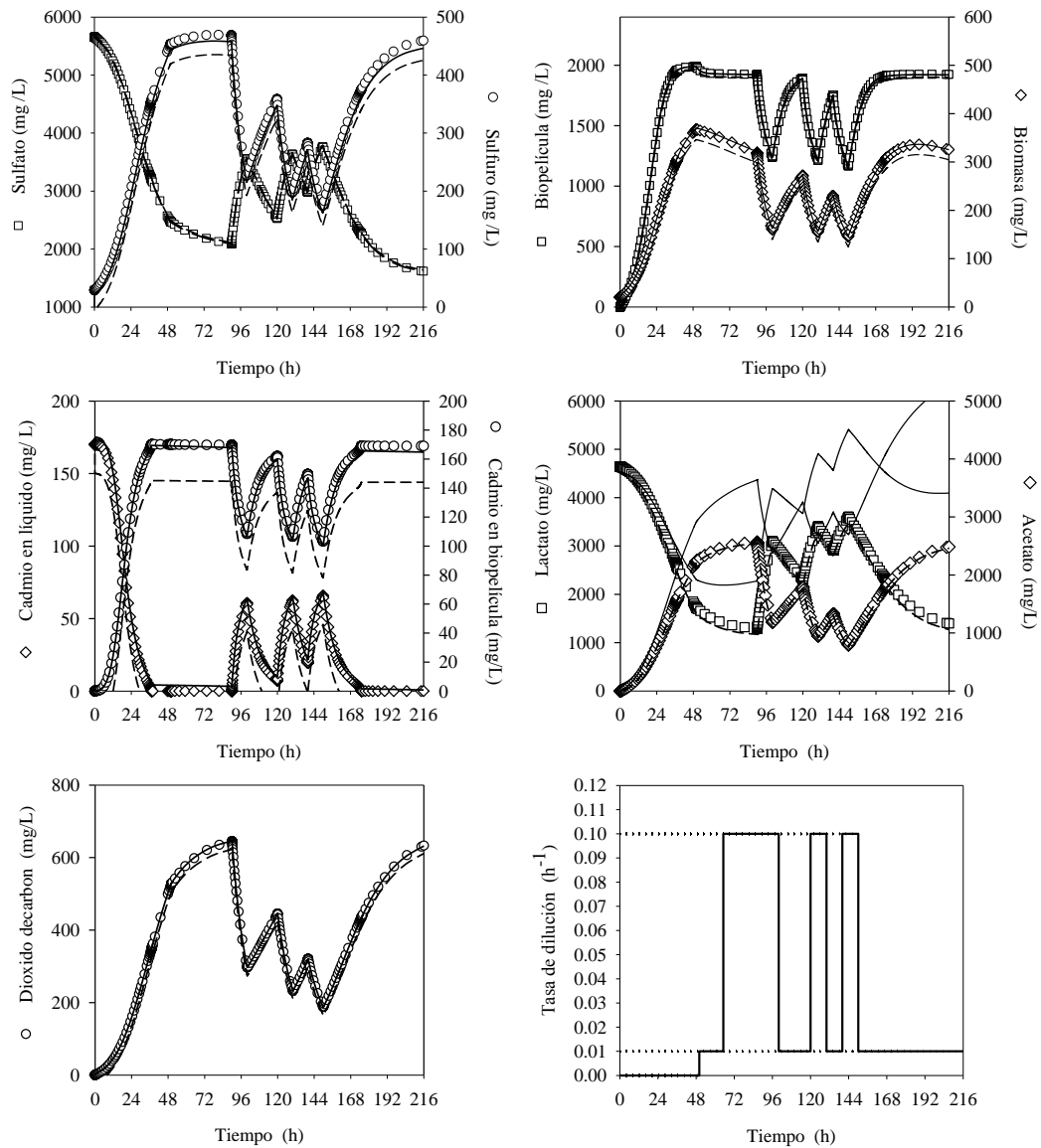


Figura 1.12 Simulación en semi-continuo. Con $C = [100000000]^T$ y $y = S$ (Concentración de sulfato). ((\circ , \square) Valores reales, (— —), Observador Luenberger y (—) Observador propuesto). Las perturbaciones son alimentadas en forma de escalón en función de la tasa



de dilución que representan valores de máxima eliminación de cadmio $D = 0.01\text{h}^{-1}$ así como a la mínima concentración de eliminación de cadmio $D = 0.1\text{h}^{-1}$.

3.5 Analisis de regulación

En este caso se propuso estabilizar indirectamente la concentración de cadmio controlando la concentración de sulfuro la cual se mide y se controla. El análisis de controlabilidad permitió concluir que la matriz de controlabilidad no es de rango completo lo que implica el proceso solamente se puede regular. La ley de control no lineal propuesta contiene una retroalimentación sigmoideal del error de control con el fin de controlar la concentración de sulfuro en el valor máximo que conduce indirectamente a regular la concentración de cadmio, cumpliendo con normativas ambientales. Un marco teórico de la estabilidad a lazo cerrado se proporciona (López et al. 2012). El empleo de información de un diagrama fase a lazo abierto permitió derivar que para regular la concentración de cadmio por debajo de 0.05 mg/L es necesario controlar la concentración de sulfuro en 475 mg/L, así seleccionamos el set-point para la implementación a lazo cerrado del controlador. (Fig. 1.13).



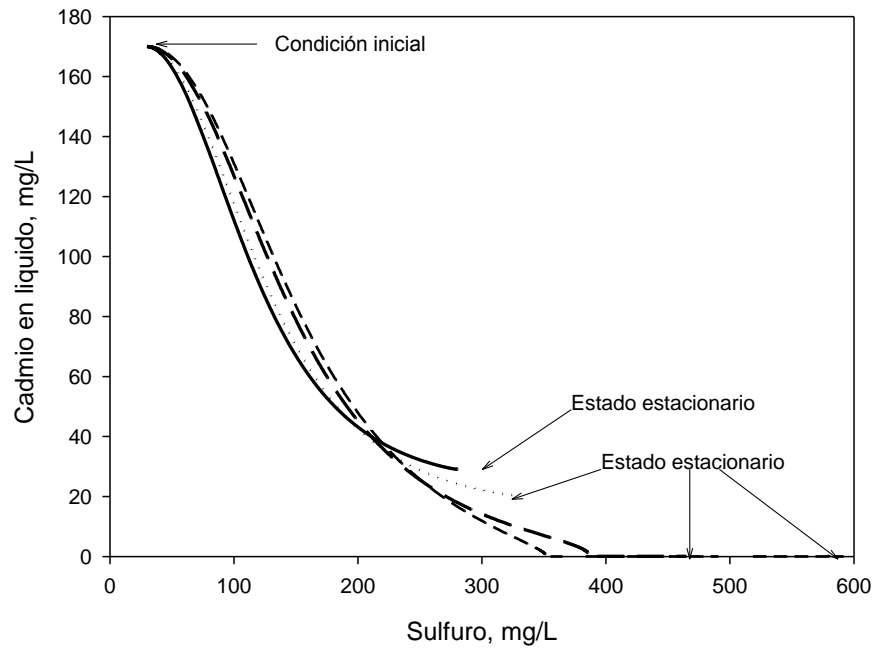


Figura 1.13 Diagrama fase para diferentes tasas de dilución $D=0$ (---), $D=0.015$ (— —), $D=0.02$ (•••) and $D=0.05$ (—).

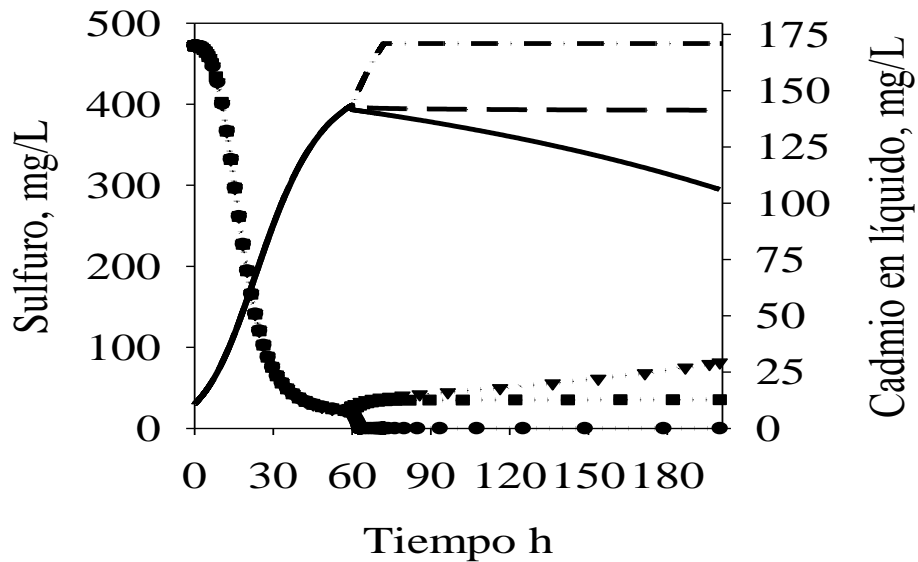


Figura 1.14 comparación del desempeño del controlador propuesto (•—•) con PI (—) y un modos deslizantes (— —) para la concentración de sulfuro, también se presenta para el



controlador propuesto la regulación de la concentración de cadmio ($\bullet\text{---}\bullet$), el PI ($\bullet\text{---}\nabla\text{---}\bullet$), y por último el modo deslizantes ($\bullet\text{---}\blacksquare\text{---}\bullet$).

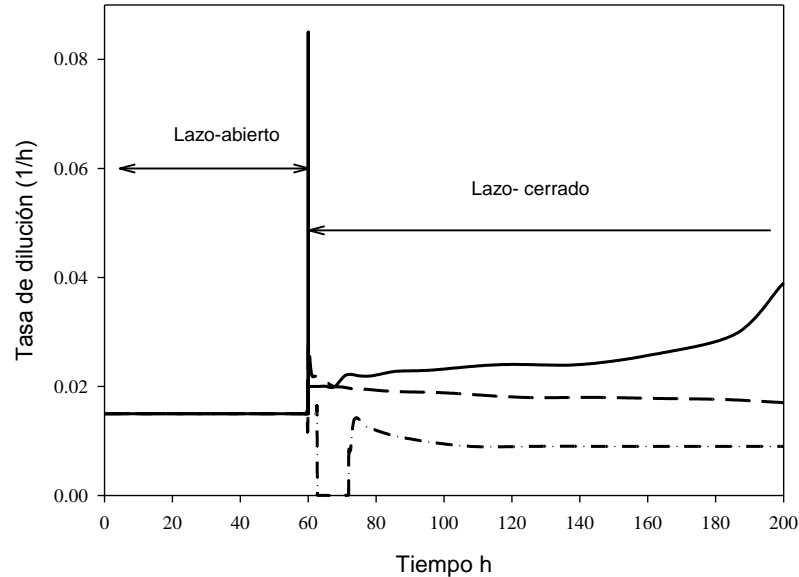


Figura 1.15 Esfuerzo de controlabilidad: Control propuesto ($\bullet\text{---}\bullet$), PI ($\bullet\text{---}\nabla\text{---}\bullet$) y modos deslizantes ($\bullet\text{---}\blacksquare\text{---}\bullet$)

Por consiguiente, la concentración de cadmio se mantiene en 0.05 mg/L, como consecuencia de regular la concentración de sulfuro a 475 mg/L (véase Fig. 1.14), cabe resaltar que el esfuerzo de control que operacionalmente está reflejado en la válvula de operación se encuentra en valores reales conforme al gráfico 1.15, sin embargo, el controlador proporcional integral (PI) presenta un aumento en la concentración final de cadmio $>$ a 20 mg/L, de igual forma el controlador de modo deslizante exhibe una respuesta ineficiente en la dinámica de concentración final de cadmio de 13 mg/L. Los experimentos numéricos demostraron un rendimiento satisfactorio de la metodología propuesta en comparación con los controladores: modo deslizante estándar y un PI lineal.



Capítulo 4

Conclusiones

globales



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

- i. La precipitación y adsorción en biopelícula del sulfuro de cadmio, fueron los mecanismos principales en la remoción de Cd^{2+} , utilizando la cepa *Desulfovibrio alaskensis* 6SR en un biorreactor anaerobio.
- ii. Se removió en un reactor por lote el 99.9 % ($169.95 \text{ mg/L} = 1910.0 \text{ } \mu\text{mol}$) de una concentración inicial de 170 mg/L de Cd^{2+} y vía simulación un 99 % para una operación en continuo.
- iii. El modelo matemático propuesto se validó con un coeficiente de regresión global de 0.97 y una eficiencia del modelo global de 0.97.
- iv. La ley de control para sistemas no lineales mediante una retroalimentación de forma sigmoideal, permitió controlar la concentración de sulfuro e indirectamente estabilizar la concentración de Cd^{2+} para una operación en continuo, manteniendo la concentración de Cd^{2+} en límites de normatividad ambiental.
- v. El sistema de la remoción de Cd^{2+} no es completamente observable y presenta un máximo de cinco variables de estado a estimar, si la concentración de sulfato es la salida medible, las variables observables fueron: sulfato, biomasa, acetato, cadmio en líquido y dióxido de carbono, mientras que las variables no observables fueron: sulfuro, biopelícula, cadmio en biopelícula.



Capítulo 5

Recomendaciones



- Realizar experimentos en operación en continuo para la eliminación de cadmio, y comparar con otras dos especies.
- Realizar con el Sulfuro de cadmio producido estudios para su aplicación en la producción de hidrogeno.
- Instrumentar e implementar en un biorreactor los esquemas de control y estimación propuestos para su monitoreo en tiempo real.
- Considerar un esquema de control con ganancia variable.



Capítulo 6

Bibliografía



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

- [1] Aguilar-López R., Mata-Machuca J., Martínez-Guerra R., López-Pérez P.A. (2009) Uniformly Bounded Error Estimator for Bioprocess with Unstructured Cell Growth Models Chem. Prod. Process Model **4**:5.
- [2] Alford J.S. (2006) Bioprocess control: Advanced and challenges Comput. Chem. Eng. **30**: 1464-1475.
- [3] Alves R., Antunes F., Salvador A. (2006) Tools for kinetic modeling of biochemical networks Nat. Biotechnol. **24**(6):667-672.
- [4] Anand R.A., Douglas A.L. (2000) Bioengineering models of cell signaling. Annu. Rev. Biomed. Eng. **2**:31-53.
- [5] Andrews J.F., Graef S.P. (1971) Dynamic modeling and simulation of the anaerobic digestion process, anaerobic biological treatment process Am. Chemical Soc. Washington D.C. 105: 126-162
- [6] Bartosch S., Fite A., Macfarlane G.T. (2004) Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota Appl. Environ. Microbiol. **70**:3575–3581.
- [7] Bastin G., Dochain D. (1990) On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors, 1st Ed. Elsevier, New York 1-82
- [8] Bellgardt K.H. (2000) Bioprocess models; Baker's yeast production In: Schügerl K., Bellgardt K.H. (Eds.), Bioreaction Engineering: Modeling and Control. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany **44–105**: 277–320
- [9] Biagiola S., Figueroa J. (2004) High Gain Nonlinear Observer: Application to the Control of an Unstable Nonlinear Process Comput. Chem. Eng. **28**:1881–1898.
- [10] Borodina I., Nielsen J. (2005) From genomes to *in silico* cells via metabolic networks. Curr. Opin. Biotechnol. **16**(3): 350-355.
- [11] Castro H.F., Williams N.H., Ogram A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria FEMS Microbiol. Ecol. **31**:1-9
- [12] Chang I.S., Shin P.K., Kim B.H. (2000) Biological treatment of acid mine drainage under sulfate-reducing conditions with solid waste materials as substrate Wat. Res. **34**:1269-77
- [13] Chen Y.R., Hashimoto A.G. (1980) Substrate utilization kinetic model for biological treatment processes Biotechnol. Bioeng. **22**: 2081-2095.



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

- [14] Dochain. D (2003) State and Parameter Estimation in Chemical and Biochemical Processes: a Tutorial *J. Process Control* **13**:801-818.
- [15] Dunn I.J., Heinzle E., Ingham J., Prenosil, J.E. (2003) *Biological Reaction Engineering: Dynamic Modeling Fundamentals with Simulation Examples* Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 8-53
- [16] Elliott P., Ragusa S., Catcheside D. (1998) Growth of sulfate reducing bacteria under acidic conditions in an anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage *Wat. Res.* **32**:3724-30.
- [17] Ewart C., Fengb D.D, Ponsc M.N., Soncini-Sessad R., Stratene G. (2006) Dealing with bio- and ecological complexity: Challenges and opportunities *Annu. Rev. Control* **30**:91-101
- [18] Flemming H.C., Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol* **8**:623–633
- [19] Gibso G.R. (1990) Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria *Journal of Appl. Microbiol.* **69**:769-797
- [20] Goldberg H. (2000) What is Virtual Instrumentation? *IEEE Instrum. Meas. Mag.* **6**:10-13
- [21] Gombert A.K., Nielsen J. (2000) Mathematical modelling of metabolism *Current Opinion in Biotechnology Biochem. Eng.* **11**:180–186
- [22] Goto S., Kanehisa M. (2007) Prediction of missing enzyme genes in a bacterial metabolic network. Reconstruction of the lysine-degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *The FEBS Journal* **274**(9):2262-2273.
- [23] Hedin R.S. Nairn R.W. (1991) In *Proceedings of the International Symposium on Constructed Wetlands for Water-quality Improvement* 187–195, Lewis Publishers
- [24] Holmer M., Storkholm P. (2001) Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review *Freshwater Biology* **46**: 431±451
- [25] Ito T., Okabe S., Satoh H., Watanabe, Y. (2002). Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biopellicula growing under microaerophilic conditions *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1392–1402
- [26] Jeff H., Farren I., James J.C. (2001) Computational studies of gene regulatory networks: In *numero molecular biology Nat. Rev. Genet.* **2**:268-279.
- [27] Kim S.D., Kilbane J.J., Cha D.K. (1999). Prevention of acid minedrainage by sulfate reducing bacteria: organic substrate addition to mine waste piles *Env. Eng. Sci.* **16**:139-45



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

- [28] Komives C., Parker R.S. (2003) Bioreactor state estimation and control *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**:468-474.
- [29] Larsson T., Skogestad S. (2000) Plantwide control: A review and a new design procedure *Modeling Identification and Control* **21**: 209-240.
- [30] López-Pérez P. A., Acevedo-Gómez R., Aguilar-López R. (2009) On the stability and regulation of a continuous aerobic bioreactor via a class of nonlinear proportional controller, 8th world congress of chemical engineering (wcc8).
- [31] López Pérez P. A., Neria González M. I., Aguilar López R. (2012) Cadmium concentration stabilization in a continuous sulfate reducing bioreactor via sulfide concentration control *Chemical Papers*, Springer Verlag, **67**(3):326–335.
- [32] Matias P.M., Pereira I.A.C., Soares C.M., Carrondo M.A. (2005) Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **89**:292–329.
- [33] Moosa S., Nemati M. Harrison S.T.L. (2002) A kinetic study on anaerobic reduction of sulfate, Part I: Effect of sulfate concentration *Chem. Eng. Sci.* **57**: 2773-2780.
- [34] Moosa S., Nemati M., Harrison S.T.L. (2005) A kinetic study on anaerobic reduction of sulfate, Part II: incorporation of temperature effects in the kinetic model. *Chem. Eng. Sci.* **60**: 3517-3524
- [35] Morillo J.A., Aguilera M., Ramoz-Cormenzana A., Monteoliva Sanchez M. (2006) Production of a metal-binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate *Curr. Microbiol.* **53**:189–193
- [36] Moser A. Rehm H.J. Reed G. (1985) Kinetics of batch fermentations in *Biotechnology Fundamentals of Biochemical Engineering* Verlaag Chemie, Weinheim, 243–283
- [37] Neria-González I., Wang E.T., Ramírez F., Romero J.M., Hernández-Rodríguez C. (2006) Characterization of Bacterial Community Associated to Biopelículas of Corroded Oil Pipelines from the Southeast of Mexico *Anaerobe* **12**: 122-133.
- [38] Neria González M. I., Rosales Acosta B., López Pérez P., Aguilar López R. (2012) O obtención y análisis de sustancias poliméricas extracelulares producidas por *desulfovibrio alaskensis* 6SR, de importancia biotecnológica. AMIDIQ.
- [39] Norma oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los limites maximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales
- [40] Pavlostathis S.G., Giraldo-Gomez E. (1991) Kinetics of Anaerobics Treatment *Wat. Science Tech.* **24**: 35-59.



- [41] Postgate J.R. (1984) *The Sulphate-reducing Bacteria* (2nd edn), Cambridge University Press. 75-90.
- [42] Rani, K.Y., Rao, V.S.R. (1999) Control of fermenters – a review *Bioprocess Engineering* **21**:77-78.
- [43] Renedo Omaechevarría J., García Posadas H., Rico Gutierrez J.L., Fernández Ferreras J. (2007) First Essays for Cadmium Wastewater Elimination by Sulphate-Reducing Bacteria. *Int. J. Chem. Reactor Eng.* **5**:1
- [44] Robert D.P. (1997) Development of kinetic models in the nonlinear world of molecular cell biology *Metabolism.* **46**:1489-1495.
- [45] Robert D.P., Tom M. (2001) Kinetic modeling approaches to in vivo imaging *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:898-907.
- [46] Salehizadeh H., Shojaosadati S.A. (2003) Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Res.* **37**:4231–4235.
- [47] Schaeffer E.J., Futran M. (2004) Challenges of Computer Aided Design of Bioprocesses VI Conference of Computer Aided Process Design. Princeton, New Jersey, 30-40.
- [48] Schugerl K., Bellgardt K.H. (2000) *Bioreaction Engineering: Modeling and Control.* Springer-Verlag, 1-30.
- [49] Sevelle B., Bertalan G. (2000) Development of a MATLAB based bioprocess simulation tool. *Bioprocess Eng.* **23**:621-626
- [50] Shimizu H. (2002) Metabolic Engineering Integrating Methodologies of Molecular Breeding and Bioprocess Systems Engineering *J. Biosci. Bioeng.* **94**(6): 563–573.
- [51] Soroush M. (1998) State and Parameter Estimations and Their Applications in Process Control *Comput. Chem. Eng.* **23**:229-245.
- [52] Spirin V., Gelfand M.S., Mironov A.A., Mirny L.A. (2006) A metabolic network in the evolutionary context: multiscale structure and modularity *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(23):8774-8779.
- [53] Steffens M.A., Lant P.A. (1999) Multivariable Control of Nutrients Removing Activated Sludge Systems, *Water Res.* **33**(12): 2864.
- [54] Tyson J.J., Kathy C., Bela N. (2001) Network dynamics and cell physiology *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:908-916.



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

- [55] Weijers S.R., Kok J.J., Preisig H.A. (1995) Control strategies for nitrogen removal plants and MPC applied to a predenitrification plant, *Proc. 9 th FAB, Med. Fac. Landb. en Toegep. Wet. Univ Gent* **60** (4b): 2435-2443.
- [56] White C., Gadd G.M. (1998) Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biopelículas *Microbiology* **144**: 1407-1415
- [57] World Health Organization, Cadmium, Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization Geneva, 1992.
- [58] Yamanishi Y., Mihara H., Osaki M., Muramatsu H., Esaki N., Sato T., Hizukuri Y., Zhang DY., Wang JL., Pan XL. (2006) Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions *J. Hazard. Mater.* **138**(3):589-593.
- [59] Zhang Q., Lo C.M., Ju L.K. (2007) Modeling Growth of *Cellulomonas cellulans* NRRLB4567 under Substrate Inhibition During Cellulase Production. *Bioresour. Technol.* **753**.



ANEXO A

Definiciones y teoremas de aplicación



Estabilidad en el sentido de Lyapunov

Un concepto fundamental en la teoría de control es el de estabilidad. En este sentido Lyapunov caracteriza la estabilidad de un punto de equilibrio; además podemos inferir deducciones acerca del comportamiento de las trayectorias de un sistema dinámico cuando ellas comienzan cerca de un punto de equilibrio, cabe señalar que estos resultados son si la necesidad de calcular o conocer explícitamente las soluciones en forma cerrada de las ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento dinámico del sistema. Comenzaremos describiendo conceptos importantes:

Sistemas Autónomos

La dinámica de un sistema no lineal puede usualmente ser representada por un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales de la forma:

$$\dot{x} = f(x) \quad (1A)$$

Donde $x \in \mathcal{R}^n$ y $f \in \mathcal{R}_+ \times \mathcal{R}^n \rightarrow \mathcal{R}^n$, esto es el objetivo de garantizar existencia, unicidad y continuidad de las soluciones para cada condición inicial.

Definición A1 El sistema no lineal (1A) se dice autónomo si f no depende explícitamente del tiempo t , o sea, si las ecuaciones del sistema son de la forma

Ahora suponga que $x = 0$ es un punto de equilibrio de (1A) esto es que

$$f(0) = 0 \quad (2A)$$

Definición A2 El punto de equilibrio $x = 0$ de (1A) es:

- Estable si, para cada $\varepsilon > 0$ hay un $\delta = \delta(\varepsilon) > 0$ tal que



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

$$\|x(0)\| < \delta \Rightarrow \|x(t)\| < \varepsilon, \forall t \geq 0$$

- Inestable si no es estable, y
- Asintóticamente estable si es estable y existe una $r(x_0) > 0$ tal que

$$\|x(0)\| < r(x_0) \Rightarrow \lim_{t \rightarrow \infty} x(t) = 0$$

Observación A1 Sea $r > 0$ el conjunto $B_r = \{x \in \mathfrak{R}^n \mid \|x\| < r\}$ define una vecindad de radio r alrededor del origen $x = 0$

Método directo de Lyapunov

El método directo de Lyapunov basa su idea en las variaciones respecto del tiempo de una función escalar no negativa, cuyo valor puede ser interpretado como la energía total del sistema, es decir, si la dinámica del sistema es tal que la energía del sistema decrece, entonces eventualmente el sistema alcanza su estado de equilibrio.

Teorema A1 Sea $x = 0$ un punto de equilibrio para (2A) y V una función continuamente diferenciable, $D \subset \mathfrak{R}^n$ y definida positiva, tal que

$$V(0) = 0 \text{ en } B_r$$

$$\dot{V}(x) \leq 0 \text{ en } B_r, \forall x \in D$$

Entonces, $x = 0$ es estable.

Si



$$\dot{V}(x) \leq 0 \text{ en } B_r - \{0\}$$

Entonces $x = 0$ es a estable. ■

Teorema A2 el punto de equilibrio $x = 0$ de (2A) es exponencialmente estable si existen dos números positivos α y λ tales que

$$\|x(t)\| \leq \alpha \|x(0)\| e^{-\lambda t}, \forall t > 0$$

En alguna bola B_r alrededor de origen. ■

Método indirecto de Lyapunov

El primer método o método indirecto de Lyapunov expresa que las propiedades de estabilidad de un sistema no lineal, en una vecindad cercana a un punto de equilibrio, su fundamento se basa esencialmente que son las mismas que las de su aproximación lineal.

Sea el polinomio característica $p(s) = \det(sI - A) = s^n + a_1 s^{n-1} + \dots + a_n$, donde $A \in \mathfrak{R}^{n \times n}$ es la matriz de aproximación lineal del sistema y $a_i \in \mathfrak{R}, i = 1, \dots, n$. Ahora bien cuando todos los valores propios de la matriz A satisfacen la condición $Re \lambda_i < 0 \forall i$ entonces, A se llama una matriz estable o matriz de Hurwitz.

Teorema A3 Sea $x = 0$ un punto de equilibrio para el sistema no lineal (2A) donde f es continuamente diferenciable en una vecindad del origen. Sea

$$A = \left. \frac{\partial f}{\partial x} (x) \right|_{x=0}$$

Entonces,



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

- Si $Re \lambda_i < 0$ para todos los valores propios de $A \Rightarrow$ el punto de equilibrio es asintóticamente estable.
- Si $Re \lambda_i > 0$ para todos los valores propios de $A \Rightarrow$ el punto de equilibrio es inestable.
- No se puede concluir nada acerca de la estabilidad del sistema no lineal (2A) cuando la aproximación lineal tiene al menos un valor propio sobre el eje imaginario.

Observación 2 Las condiciones de estabilidad basadas en la aproximación lineal de un sistema no lineal son totalmente locales. Para estudiar la estabilidad global asintótica es necesario recurrir al método directo de Lyapunov. Si algunos valores propios de A tienen parte real igual a cero y el resto parte real negativa, entonces las técnicas anteriores son inconclusas. En tales casos la estabilidad del equilibrio está determinada por los términos de orden más alto que se eliminan en el procedimiento de linealización.

Sistemas no autónomos

Cabe mencionar que los teoremas para sistemas autónomos se pueden extender para sistemas no autónomos. El sistema (1) donde aparece explícitamente el tiempo se conoce como un sistema no autónomo, los puntos de equilibrio x^* para (2) quedan definidos por las soluciones (constantes) de la ecuación

$$f(x^*, t) = 0 \quad \forall t \geq 0$$

Definición A3 Una función escalar variante en el tiempo $V(t, x)$ es definida positiva si $V(t, 0) = 0 \quad \forall t \geq 0$ y si existe una función $v_0(x)$ definida positiva e invariante en el tiempo tal que $v_0(x) \leq V(t, x), \forall x \in \mathfrak{R}^n$ y $\forall t \geq 0$. Por otra parte $V(t, x)$ se dice decreciente si y si existe una



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

función $v_1(x)$ definida positiva e invariante en el tiempo tal que $V(t, x) \leq v_1(x), \forall x \in \mathfrak{R}^n$ y $\forall t \geq 0$ ■

Definición A4 Una función continua $\sigma : [0, a) \rightarrow \mathfrak{R}_+$ se dice que es de clase K si es estrictamente creciente y $\sigma(0) = 0$. La función σ se dice que es de clase K_∞ si $a = \infty$ y $\sigma(r) \rightarrow \infty$ cuando $r \rightarrow \infty$

Lema Sea $V(x) : D \rightarrow \mathfrak{R}$ una función continua y definida positiva en un dominio $D \subset \mathfrak{R}^n$ que contiene al origen. Sea $B_r \subset D$ para alguna $r > 0$ Entonces, existen funciones α_1 y α_2 de clase K, definidas sobre $[0, r]$ tales que

$$\alpha_1(\|x\|) \leq V(x) \leq \alpha_2(\|x\|)$$

Método directo de Lyapunov para Sistemas No Autónomos

Teorema A4 El punto de equilibrio $x = 0$ del sistema (1A) es estable si existe una función de clase C^1 y definida positiva $V : \mathfrak{R}_+ \times \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}$ y una constante $r > 0$ tales que

$$\dot{V}(t, x) \leq 0, \forall x \in B_r, \forall t \geq t_0 \geq 0$$

Donde \dot{V} es evaluada a lo largo de las trayectorias de (1A)

Teorema A5 El punto de equilibrio $x = 0$ del sistema (1A) es uniformemente estable si existe una función de clase C^1 decreciente y definida positiva $V : \mathfrak{R}_+ \times \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}$ y una constante $r > 0$ tales que

$$\dot{V}(t, x) \leq 0, \forall x \in B_r, \forall t \geq 0$$



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Donde \dot{V} es evaluada a lo largo de las trayectorias de (1A)

Teorema A6 El punto de equilibrio $x = 0$ del sistema (1A) es uniformemente asintóticamente estable si existe una función de clase C^1 decreciente, definida positiva $V : \mathfrak{R}_+ \times \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}$ tal que $-\dot{V}(t, x)$ es una función definida positiva

Teorema A7 sea $x = 0$ un punto de equilibrio del sistema (1A) y $D \subset \mathfrak{R}^n$ un dominio que *contiene* a $x = 0$. Sea $V : \mathfrak{R}_+ \times D \rightarrow \mathfrak{R}$ una función continuamente diferenciable tal que

$$W_1(x) \leq V(t, x) \leq W_2(x)$$

$$\dot{V} = \frac{\partial V}{\partial t} + \frac{\partial V}{\partial x} f(t, x) \leq -W_3(x), \forall t \geq 0$$

Donde $W_1(x), W_2(x), W_3(x)$ SON FUNCIONES CONTINUAS Y DEFINIDAS POSITIVAS SOBRE D. ENTONCES, $x = 0$ ES UNIFORMEMENTE ASINTÓTICAMENTE ESTABLE. SI TODAS LAS SUPOSICIONES SE SATISFACEN PARA TODO $x \in \mathfrak{R}^n$ y $W_1(x)$ ES RADIALMENTE NO ACOTADA, ENTONCES $x = 0$ ES GLOBALMENTE UNIFORMEMENTE ASINTÓTICAMENTE ESTABLE. ■

Observación 3 El teorema anterior es llamado de Lasalle-Yoshizawa, por medio del cual es posible garantizar convergencia de las trayectorias del sistema a un conjunto acotado o al equilibrio.

Definición A5 Función continua, una función es continua en a si existe el límite de la función, es decir:

$$f \text{ es continua en } x = a \Leftrightarrow \lim_{x \rightarrow a} f(x) = f(a) \text{ o } f(x) \rightarrow af(a)$$



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

O bien una función f es continua en $a \in A$ es un punto aislado, es decir a no es un punto de acumulación.

Teorema A7 Desigualdad del triángulo, sean $a, b, c \in \mathfrak{R}$

$$|a + b| \leq |a| + |b|$$

Teorema A8. Teorema del valor medio. Sea $f : [a, b] \rightarrow \mathfrak{R}$ una función continua en todo el intervalo $[a, b]$ y derivable en el intervalo abierto (a, b) . Entonces existe al menos un punto c en el intervalo (a, b) , tal que

$$f(b) - f(a) = f'(c)(b - a)$$

Definición A6 Dos funciones positivas son equivalentes (\approx) si su cociente está acotado por arriba y por abajo.

Definición A7 La condición de *Lipschitz* es una condición intermedia entre la continuidad y la condición de continuidad de la derivada parcial. Función Lipschitz continua. Sea X un intervalo en \mathfrak{R} y sea $f : X \rightarrow \mathfrak{R}$ una función. Se dice que f es Lipschitz continua si existe una constante $K > 0$ tal que

$$|f(x) - f(u)| = K(x - u)$$

Más exactamente.

- Si f es localmente *Lipschitziana* en un punto entonces es continua en dicho punto
- Si f es de clase C^1 en un punto entonces f es localmente *Lipschitziana* en dicho punto.

Definición A8. Una secuencia $\{x_k\}$ en X converge a un vector $x \in X$ si

$$\|x_k - x\| \rightarrow 0 \text{ cuando } k \rightarrow \infty$$



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Definición A9. Secuencia de Cauchy Una secuencia $\{x_k\}$ en X se dice secuencia de Cauchy si

$$\|x_k - x_m\| \rightarrow 0 \text{ cuando } k, m \rightarrow \infty$$

Proposición A1. Cualquier función continuamente derivable en un intervalo finito cerrado es Lipschitz continua. Sea $f \in C^1([a, b])$, esto es, f es derivable en $[a, b]$ y su derivada es continua en $[a, b]$ Entonces f es Lipschitz continua en $[a, b]$

Definición A10 Criterio de Cauchy (raíz enésima)

Sea una serie $\sum_{k=1}^{\infty} a_k$, tal que $a_k > 0$ (términos positivos), y supongamos que existe

$$\lim_{k \rightarrow \infty} \sqrt[k]{a_k} = L \quad L \in [0, \infty)$$

Entonces, si:

$L < 1$, la serie es convergente.

$L > 1$ entonces la serie es divergente.

$L=1$, no podemos concluir nada a priori y tenemos que recurrir al criterio de Raabe, o de comparación, para ver si podemos llegar a alguna conclusión

Nota: El más importante criterio para probar que una sucesión converge sin conocer su límite es

Lema A1 de Barbalat

Si la función $f(t)$ es diferenciable, tiene un límite finito cuando $t \rightarrow \infty$ y $f'(t)$ es uniformemente continua, entonces $f'(t) \rightarrow 0$ cuando $t \rightarrow \infty$.

Nota: Este es un resultado puramente matemático concerniente a las propiedades asintóticas de una función y sus derivadas. Cuando se utilizan sus propiedades en sistemas no-autónomos, se pueden solucionar muchos problemas de estabilidad asintótica.

Definición A11 Funciones acotadas superiormente

Una función f se dice que está acotada superiormente si existe un número real M tal que



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

$$f(x) \leq M \quad \forall x \in \text{Dom}(f)$$

Este número real M recibe el nombre de **COTA SUPERIOR** de la función f . Geométricamente significa que ninguna imagen es superior al valor M y, por tanto, la gráfica de la función f estará por debajo de la recta $y = M$ condición de ser “localmente Lipschitz” es básicamente un requisito de suavidad.

Definición A12 Funciones acotadas inferiormente.

Una función f se dice que está acotada inferiormente si existe un número real m tal que

$$f(x) \geq m \quad \forall x \in \text{Dom}(f)$$

Este número real m recibe el nombre de **COTA INFERIOR** de la función f . Geométricamente significa que ninguna imagen es inferior al valor m y, por tanto, la gráfica de la función f estará por encima de la recta $y = m$.



ANEXO B



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Algoritmos diseñados en MATLAB®

```
% Algoritmo para estimación
```

```
[t,y] = ode23s('CONTINUObservador',[0 216],[ 5655 29 20 0 170 .01 4640 0.1 0.1 5055 20 38 0 160
.1 4540 .09 .02 5055 20 38 0 160 .1 4540 .09 .02 ]);
```

```
subplot(9,3,1);
plot(t,y(:,1), '*',t,y(:,10), '--',t,y(:,19), '-')
xlabel(' Tiempo [h] ')
ylabel(' sulfato [mg/L]')
subplot(9,3,2);
plot(t,y(:,2), '*',t,y(:,11), '--',t,y(:,20), '-')
xlabel(' Tiempo [h]')
ylabel(' sulfuro [mg/L]')
subplot(9,3,3);
plot(t,y(:,3), '*',t,y(:,12), '--',t,y(:,21), '-')
xlabel(' Tiempo [h]')
ylabel(' biomasa [mg/L]')
subplot(9,3,4);
plot(t,y(:,4), '*',t,y(:,13), '--',t,y(:,22), '-')
xlabel(' Tiempo [h]')
ylabel(' biopelícula [mg/L]')
subplot(9,3,5);
plot(t,y(:,5), '*',t,y(:,14), '--',t,y(:,23), '-')
xlabel(' Tiempo [h]')
ylabel(' cadmio en líquido [mg/L]')
subplot(9,3,6);
plot(t,y(:,6), '*',t,y(:,15), '--',t,y(:,24), '-')
xlabel(' Tiempo [h] ')
ylabel(' cadmio en biopelícula [mg/L]')
subplot(9,3,7);
plot(t,y(:,7), '*',t,y(:,16), '--',t,y(:,25), '-')
xlabel(' Tiempo [h]')
ylabel(' lactato [mg/L]')
subplot(9,3,8);
plot(t,y(:,8), '*',t,y(:,17), '--',t,y(:,26), '-')
xlabel(' Tiempo [h]')
ylabel(' acetato [mg/L]')
subplot(9,3,9);
plot(t,y(:,9), '*',t,y(:,18), '--',t,y(:,27), '-')
xlabel(' Tiempo [h]')
ylabel(' CO2 [mg/L]')
```

```
hold on
```

```
% Rutina donde se implementa el observador y el modelo
```



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

```
Lac1=107;
EPS1=4300;
k6=25.68;
k7=179.59;
k8=.005;
kace=1500;
kd=0.062;
keps=0.23;
klac=95000;
klaci=52;
kp=1990;
ks=0.0009048;
ksf=0.5;
kco=900;
```

% Velocidades

```
umaxbio=(0.9);
umax=(0.13);
umax3=(1.8);
umax4=(.6);
umax5=(.12);
```

% Observador

```
K=50.9;
```

% Non linear

```
e=y(1)-(y(19));
u=(1/K)*(e/(sqrt(1+ e^2)));
```

% Luenberger

```
e1=y(1)-(y(10));
```

% Exponentes

```
d=0.12;
c=3.1;
z=0.9146;
n=1.9;
g=1.5;
w=.001;
```

% Rendimientos

```
Y=7.5;
YA= 6;
YL= 2;
YP= 1;
```

% Condiciones iniciales

```
So=5055;
Lo=4640;
Cdlo=169;
```

% D=0.01 1/h;

```
dy = zeros(27,1);
```

% sulfato

```
dy(1)= (-Y)*((umax*((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1))))*y(3))*(y(7)^w)+ D*(So-y(1));
```



Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

```

% sulfuro
dy(2) = umax*((YP)*((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1)))*y(3))*(y(7)^w)-D*y(2);
% biomasa
dy(3) = umax*(((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1)))*y(3)-(kd)*y(3))*(y(7)^w)-D*y(3);
% biomasa muerta
% dy(4) = kd*y(3);
% biopelícula
dy(4) = umaxbio*((y(1)^n)/(ks+(y(1)^n)))*y(3)*(y(7)^0.001)*(1-((y(4)/kp)^2))-D*y(4);
% cadmio in líquido
dy(5) = -umax3*((y(5))/(k6+y(5)+((y(5)^2)/k8)))*((1-(y(6)/k7))^c)*y(4)*y(3)*5+D*(Cdlo-y(5));
% cadmio in biopelícula
dy(6) = umax3*((y(5))/(k6+y(5)+((y(5)^2)/k8)))*((1-(y(6)/k7))^c)*y(4)*y(3)*5 -D*y(6);
% lactato
dy(7) = (-umax4)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kace/(kace+y(8)))*1.5 +D*(Lo-y(7));
% acetato
dy(8) = (umax4)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kace/(kace+y(8)))*1.15-D*y(8);
% precipitado
% dy(9) = .9*((y(5))/(k6+y(5)+((y(5)^2)/k8)))*((1-(y(2)/k7))^c)*y(2);
% CO2
dy(9) = (umax5)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kco/(kco+y(9)))-D*y(9);
% OBSERVADOR LUENBERGER
dy(10) = (-Y)*((umax*((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1)))*y(3))*(y(7)^w)+ D*(So-y(1)) + K*e1;
dy(11) = umax*((YP)*((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1)))*y(3))*(y(7)^w)-D*y(2)+K*e1;
dy(12) = umax*(((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1)))*y(3)-(kd)*y(3))*(y(7)^w)-D*y(3)+ K*e1;
dy(13) = umaxbio*((y(1)^n)/(ks+(y(1)^n)))*y(3)*(1-((y(4)/kp)^2))*(y(7)^0.001)-D*y(4)+ K*e1;
dy(14) = -umax3*((y(5))/(k6+y(5)+((y(5)^2)/k8)))*((1-(y(6)/k7))^c)*y(4)*y(3)*5+D*(Cdlo-y(5))+
K*e1;
dy(15) = umax3*((y(5))/(k6+y(5)+((y(5)^2)/k8)))*((1-(y(6)/k7))^c)*y(4)*y(3)*5 -D*y(6)+ K*e1;
dy(16) = (-umax4)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kace/(kace+y(8)))*1.5 +D*(Lo-y(7))+ K*e1;
dy(17) = (umax4)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kace/(kace+y(8)))*1.15-D*y(8)+ K*e1;
dy(18) = (umax5)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kco/(kco+y(9)))-D*y(9)+ K*e1;
% OBSERVADOR NO LINEAL
dy(19) = (-Y)*((umax*((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1)))*y(3))*(y(7)^w)+ D*(So-y(1)) + u;
dy(20) = umax*((YP)*((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1)))*y(3))*(y(7)^w)-D*y(2)+ u;
dy(21) = umax*(((1-(y(2)/S1))^n)*(y(1)/(ks+y(1)))*y(3)-(kd)*y(3))*(y(7)^w)-D*y(3)+ u;
dy(22) = umaxbio*((y(1)^n)/(ks+(y(1)^n)))*y(3)*(1-((y(4)/kp)^2))*(y(7)^0.001)-D*y(4)+ u;
dy(23) = -umax3*((y(5))/(k6+y(5)+((y(5)^2)/k8)))*((1-(y(6)/k7))^c)*y(4)*y(3)*5+D*(Cdlo-y(5))+ u;
dy(24) = umax3*((y(5))/(k6+y(5)+((y(5)^2)/k8)))*((1-(y(6)/k7))^c)*y(4)*y(3)*5 -D*y(6)+ u;
dy(25) = (-umax4)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kace/(kace+y(8)))*1.15 +D*(Lo-y(7))+ u;
dy(26) = (umax4)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kace/(kace+y(8)))*1.5-D*y(8)+u;
dy(27) = (umax5)*((y(7)^g)/(klac+(y(7)^g)))*y(3)*(kco/(kco+y(9)))-D*y(9)+ u;

```



Anexo C

Artículos aceptados



A MATHEMATICAL MODEL FOR CADMIUM REMOVAL USING A SULFATE REDUCING
BACTERIUM: *Desulfovibrio alaskensis* 6SR

López-Pérez, P.A., Neria-González, M.I., Flores-Cotera, L.B. and Aguilar-López R.

Accepted to Online Publish, 2012, International Journal of Environmental Research

Cadmium concentration stabilization in a continuous sulfate reducing bioreactor via sulfide
concentration control

^aPablo Antonio López Pérez, ^bM. Isabel Neria González, ^aRicardo Aguilar López

^aDepartment of Biotechnology & Bioengineering CINVESTAV-IPN, Instituto Politécnico Nacional
2508,

San Pedro Zacatenco, DF, 07360 México

^bChemical and Biochemical Engineering División, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec,
Tecnológico,

Valle de Anáhuac, Ecatepec de Morelos, 55210 México

Chemical Papers, Springer Verlag, 67 (3) 326–335 (2013)

DOI: 10.2478/s11696-012-0274-8

